

CONICET



I B R

Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Estudio de la interacción del metabolismo del nitrógeno y del carbono en micobacterias.

Julián Agustín Bulssico

Tesis para optar al título de Licenciado en Biotecnología

Director: Dr. Hugo Gramajo

Director Asistente: Lic. Matías Cabruja

Rosario, Argentina

2018

Índice

<i>Agradecimientos</i>	5
<i>Abreviaturas</i>	6
<i>Resumen</i>	8
<i>Introducción</i>	9
1 Tuberculosis	9
2 El género <i>Mycobacterium</i>	11
3 <i>Mycobacterium smegmatis</i> como modelo de estudio.....	12
4 Envoltura celular de las micobacterias.....	12
5 Patogénesis de la tuberculosis	14
6 Metabolismo del nitrógeno y su rol en la virulencia.....	18
7 Regulación de los metabolismos de nitrógeno y carbono en <i>actinomyetales</i>	20
<i>Objetivos</i>	25
<i>Materiales y Métodos</i>	27
1 Cepas bacterianas y plásmidos	27
2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano.....	29
2.1 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	29
2.2 Medios de cultivo para <i>M. smegmatis</i>	29
2.3 Composición de los medios	30
3 Transformación de las cepas bacterianas.....	31

3.1 Transformación de <i>E. coli</i>	31
3.2 Transformación de <i>M. smegmatis</i>	31
4 Manipulación de ADN	32
4.1 Tratamiento con enzimas de restricción y ligación de ADN.....	32
4.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	32
4.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	32
4.4 Secuenciación de nucleótidos y análisis de secuencias.....	33
4.5 Extracción de ADN genómico de <i>M. smegmatis</i>	33
4.6 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	33
5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
6 PCR de colonia	34
7 Construcción de plásmidos.....	34
8 Ensayos de crecimiento.....	36
9 Cromatografía en capa delgada (TLC)	37
10 Ensayo de la síntesis <i>de novo</i> de lípidos	37
Resultados	38
1 Construcción de la mutante en el gen MSMEG_0432 de <i>M. smegmatis</i> ..	38
2 Construcción de cepa complementante <i>M. smegmatis</i> Δ nlpR::pJC0432	40
3 Ensayos de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> utilizando cloruro de amonio como única fuente de nitrógeno	41
4 Crecimiento de <i>M. smegmatis</i> utilizando nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno	43
5 Ensayos de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> utilizando nitrito de sodio como única fuente de nitrógeno	44

6	Crecimiento de cepa complementante <i>M. smegmatis</i> $\Delta nlpR::pJC0432$ en medio mínimo con nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno.....	45
7	Crecimiento de cepa complementante <i>M. smegmatis</i> $\Delta nlpR::pJC0432$ en medio mínimo con nitrito de sodio como única fuente de nitrógeno	47
8	Análisis de la acumulación de TAG en la cepa mutante	49
9	Análisis de la síntesis <i>de novo</i> de TAG en la cepa mutante.	51
10	Análisis de la sobreexpresión del gen MSMEG_0432 sobre el perfil de síntesis de TAG.	53
	<i>Discusión y Conclusiones</i>	55
	<i>Referencias bibliográficas</i>	60

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a mi Familia por permitirme haber llegado hasta donde estoy hoy parado, habiendo transitado conmigo este largo camino, que no comenzó hace seis años, sino mucho antes. Para ellos, el mayor de mis afectos: mis viejos Clau y Beto, mi hermana Luli y mis tres abuelos, que me acompañan ya sea físicamente o en la memoria. Todo mi cariño a mis tíos y primos que supieron estar ahí desde el primer momento.

A mis grandes formadores en esta última etapa profesional. Mi director Hugo y mi director asistente Cabru con los que tuve el placer de compartir un año de aprendizaje excepcional. A Gabi, Agos, Chichi, y el resto de los chicos del laboratorio 8 que a pesar de no estar en los papeles me ayudaron día a día con cada una de mis preguntas, con un nivel de profesionalismo y camaradería que difícilmente se encuentre en otro lugar. A todos ellos mi más sincero agradecimiento. Aunque no haya podido seguir aprendiendo con ustedes en la etapa que viene, me llevo lo mejor de sus enseñanzas.

A todas las grandes personas incondicionales con las que la vida me cruzó crucé los últimos años. Entre ellas, especial mención a Maxi, Pau y Agus que me enseñaron más de mí mismo de lo que ya conocía.

A mis compañeros de la FBioyF, excelentes profesionales con los que pude vivir una de las mejores etapas de la vida. Con ellos, la facultad me dio, además de un título, amigos para toda la vida.

A todo el plantel A2A con el que compartimos incontables prácticos entre mates y bizcochos en el subsuelo del CUASII, con su inolvidable y contagiosa manera de vivir la vida y las fiestas.

Abreviaturas

AG	Arabinogalactano
ATc.....	Anhidrotetraciclina
Am.....	Apramicina
Ap.....	Ampicilina
CGM.....	Célula gigante multinucleada
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600nm
EMB.....	Etambutol
Gm	Gentamicina
iNOS.....	Óxido Nítrico Sintasa inducible
ILI	Inclusiones lipídicas intracitoplasmáticas
INH	Isoniacida
IFN- γ	Interferón- γ
Km.....	Kanamicina
LB.....	Luria Bertani
LBA.....	Luria Bertani – agar
MDR-TB	Tuberculosis multirresistente
ME	Macrófago espumoso
PG	Peptidoglicano
PDIM	Tiocerol de dimicocerosato
Q	Quinol

RIF	Rifampicina
SL.....	Sulfolípido
SMC	Sitio de múltiple clonado
Sp.....	Espectinomicina
Sm.....	Estreptomicina
TAG	Triacilglicerol
TB.....	Tuberculosis
TDM.....	Trehalosa dimicolato
TMM	Trehalosa monomicolato
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XDR-TB	Tuberculosis extensamente resistente

Resumen

En el presente trabajo de tesina, se llevó a cabo la caracterización del regulador transcripcional putativo NlpR, codificado por el gen MSMEG_0432 de *Mycobacterium smegmatis*. Con este objetivo, se construyó una cepa mutante (*M. smegmatis* Δ nlpR) que posee una delección de 1023 pares de bases en MSMEG_0432 mediante intercambio alélico por recombinación homóloga.

El análisis del fenotipo de crecimiento de la cepa *M. smegmatis* Δ nlpR, en comparación con la cepa salvaje, demostró que la misma es incapaz de crecer utilizando nitrato de potasio o nitrito de sodio como fuentes exclusivas de nitrógeno; mientras que, al utilizar cloruro de amonio el crecimiento de la cepa mutante y salvaje fueron similares.

A su vez, la complementación de la mutación con un alelo salvaje de MSMEG_0432 a través de un vector integrativo y bajo un promotor inducible por el agregado de anhidrotetraciclina (ATc) permitió restaurar el crecimiento con nitrato de potasio y nitrito de sodio como única fuente de nitrógeno a niveles comparables con la cepa salvaje.

Estudios previos, realizados en los genes ortólogos a MSMEG_0432 en *Rhodococcus jostii* RHA1, sugirieron que dicho gen actuaría como un regulador transcripcional pleiotrópico, mediando la interacción del metabolismo de nitrógeno y carbono en respuesta a la carencia de fuentes de nitrógeno en el medio externo. Sin embargo, en el presente estudio no pudo comprobarse la influencia de MSMEG_0432 en genes relacionados al metabolismo del carbono. Las cromatografías en capa delgada (TLC) no mostraron variaciones tanto en la acumulación como en la síntesis *de novo* de TAG en las cepas mutante y salvaje. Asimismo, la sobreexpresión de dicho gen en una cepa salvaje no mostró un cambio significativo en la síntesis de lípidos neutros.

Introducción

1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por especies del género *Mycobacterium*, pertenecientes a un grupo genéticamente relacionado denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El agente etiológico más representativo de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis*, identificada por primera vez como una especie patógena por Robert Koch en 1882, de allí su denominación como bacilo de Koch¹.

La TB es predominantemente una enfermedad pulmonar (TB pulmonar) representando el 70 % de los casos; sin embargo *M. tuberculosis* puede diseminarse a otros órganos, incluyendo los nódulos linfáticos, huesos y meninges, provocando una enfermedad extrapulmonar (TB miliar o extrapulmonar) en 10-42 % de los pacientes dependiendo de la edad, estado inmune y grupo étnico ². El contagio ocurre por vía aérea cuando un individuo enfermo de TB pulmonar expelle bacterias a través de la tos, el estornudo o la salivación. Si bien basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para quedar infectada, en general, una baja proporción de los individuos infectados desarrollan la forma activa de la enfermedad.

La mayoría de los individuos son asintomáticos y se piensa que mantienen la infección en una forma latente. Los informes estadísticos estiman que entre el 5-10 % de éstos desarrollará la forma activa de la TB durante el transcurso de su vida. Este riesgo de reactivación es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmunitario está deprimido, como ocurre en casos de personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), desnutrición, diabetes mellitus o abuso de drogas.

Durante la segunda mitad del siglo XX se pensó que la TB estaba controlada; sin embargo, la aparición en 1981 del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causado por el VIH, la intensificación de las migraciones masivas y las condiciones de pobreza extrema en muchos países subdesarrollados (principalmente en Asia y África) fueron generando un terreno propicio para el

resurgimiento de enfermedades que se creían en retroceso, como la TB. Como consecuencia del incremento en el número de casos de personas infectadas, en 1993 la Organización Mundial de la Salud declaró a esta enfermedad como una emergencia de la salud pública a nivel mundial. El control de la epidemia de TB se vio dificultada por la falta de una vacuna efectiva, de diagnósticos rápidos y eficaces y fundamentalmente por la emergencia de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples drogas.

La TB fármaco-resistente aparece principalmente como consecuencia del incumplimiento efectivo del tratamiento. La TB multirresistente (MDR-TB) es una forma de TB resistente a por lo menos dos de las drogas más importantes utilizadas para el tratamiento de esta enfermedad, isoniácida (INH) y rifampicina (RIF). En el año 2006 se reportaron casos de pacientes infectados con cepas de TB extensamente resistente (XDR-TB), que presentaban resistencias adicionales a las drogas de segunda línea más efectivas. En años más recientes se han detectado, en distintos países, casos de TB con patrones de resistencia aún más amplios³.

La habilidad de *M. tuberculosis* de persistir bajo la forma de una infección asintomática por largos períodos de tiempo es un tema central en la biología de la enfermedad. Como consecuencia de ello, aun curando clínicamente al paciente, no se logra erradicar completamente al bacilo. En esta etapa, la mayoría de las bacterias están en un estado de dormancia, no replicativo y con baja actividad metabólica, y sólo una pequeña población se encuentra en división activa⁴. Entre las causas de su persistencia se encuentra la propia naturaleza del proceso infectivo, que genera la ocupación de numerosos tejidos en el huésped con un gran número de bacilos. La resistencia fenotípica del estado dormante representa uno de los mayores problemas para las quimioterapias y la capacidad limitada del sistema inmune de eliminar los bacilos presentes en las lesiones luego del tratamiento. Se considera que, en este estado latente, el uso de INH reduce el riesgo de reactivación, ya que actúa sobre las bacterias en división activa; mientras que la RIF colabora en la eliminación de la subpoblación en estado de dormancia.

La resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* a muchos quimioterapéuticos está relacionada con la barrera de impermeabilidad que le proporciona su compleja pared celular⁵. En la actualidad se están realizando numerosos esfuerzos para desarrollar drogas que bloqueen la transición entre los distintos estados activos y dormantes, o que sean particularmente efectivos en la eliminación de esta población de bacilos, de manera tal de que sirvan como antibióticos o adyuvantes que aumenten la eficacia del tratamiento.

La TB podría ser controlada mediante una mejor prevención de la infección, la interrupción de su progreso a enfermedad activa y la detección y aplicación del tratamiento en forma más rápida. Para acelerar el proceso se requiere de una mayor intervención junto al desarrollo y la implementación de nuevas drogas, vacunas y herramientas de diagnóstico.

2 El género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* consta de más de 120 especies reconocidas hasta el momento, incluyendo organismos patógenos de humanos y animales⁶. Las micobacterias son actinomicetes aerobios, ácido-alcohol resistentes como consecuencia de su compleja pared celular rica en lípidos complejos, que forman bacilos rectos o ligeramente curvos.

La separación del género *Mycobacterium* en dos grupos principales en función de la velocidad de crecimiento de sus especies, constituye una base de la taxonomía micobacteriana. A pesar de no respetar exactamente esta división, la mayoría de las especies de crecimiento lento (tiempo de duplicación ~ 24 h) están asociadas o son las causantes de enfermedades en humanos o animales. En cambio, la mayoría de las especies de crecimiento rápido (tiempo de duplicación ~ 3 h) no son patógenas.

3 *Mycobacterium smegmatis* como modelo de estudio

El estudio genético de *M. tuberculosis* se vio retrasado durante muchos años debido a ciertas características que dificultan el trabajo con esta bacteria, entre ellas su crecimiento lento (tiempo de duplicación de aproximadamente 16 horas), el requerimiento de altos niveles de bioseguridad para su manipulación, su tendencia a formar grumos durante el crecimiento en medio líquido y la falta de sistemas eficientes para la transferencia de genes.

Si bien estudios en *Escherichia coli* y *Streptomyces lividans* sirvieron para definir la función de algunas proteínas, el uso de hospedadores homólogos como modelo de estudio lleva a un entendimiento más acertado de la biología de este patógeno⁷.

A diferencia de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* es una especie de crecimiento rápido (con un tiempo de duplicación de aproximadamente 3 horas), fácilmente cultivable *in vitro*, donde forma colonias visibles en un período de tres a cinco días. Se la considera una micobacteria no patógena, y dado que se ha encontrado en suelo y agua se lo considera un microorganismo ambiental. La cepa salvaje presenta una baja eficiencia de transformación con plásmidos, dificultad que fue superada con el aislamiento de una cepa mutante con alta eficiencia de transformación, denominada *M. smegmatis* mc²155⁸, la cual presenta diferencias en la composición de su pared celular⁹. Por las características anteriormente detalladas, y la disponibilidad de su secuencia genómica, la cepa *M. smegmatis* mc²155 se ha convertido en un microorganismo modelo para el estudio de la función de los genes micobacterianos.

4 Envoltura celular de las micobacterias

Las micobacterias son relativamente resistentes al desecamiento y al tratamiento con álcali y numerosos desinfectantes químicos, dificultando en consecuencia la prevención de la transmisión de *M. tuberculosis* en espacios comunes. Esta resistencia intrínseca general, y en particular a la mayoría de los antibióticos y agentes quimioterapéuticos, se debe a la presencia de una inusual

envoltura celular, rica en polisacáridos y lípidos complejos⁵. La elevada impermeabilidad se debe por un lado a la ineficiencia de las porinas micobacterianas para permitir la permeabilidad de solutos hidrofílicos y su existencia en baja concentración¹⁰, y por otro lado al grosor anormal de la envoltura celular y su baja fluidez, lo cual repercute directamente en la permeabilidad.

La contribución de envoltura celular en el proceso infectivo y en la persistencia de *M. tuberculosis* se refleja en la capacidad de algunos complejos lipídicos asociados a la pared de actuar en la modulación de la respuesta inmune del huésped^{11,12}. A su vez, numerosas drogas utilizadas actualmente en el tratamiento contra la TB están dirigidas a la biosíntesis de componentes esenciales de la pared celular de las micobacterias, como INH y etambutol (EMB), los cuales afectan la biosíntesis de ácidos micólicos y de otros componentes de la pared celular¹³⁻¹⁷.

El contenido lipídico de la envoltura celular de las micobacterias representa hasta un 40 % de su peso seco¹⁸, siendo responsable de su crecimiento agrumado en medio líquido y de sus propiedades de tinción ácido alcohol resistente. En la figura 1 se puede observar un diagrama de la envoltura celular micobacteriana, compuesta por una membrana plasmática, similar a la presente en otras bacterias, rodeada por una compleja pared rica en carbohidratos y lípidos, la cual a su vez se encuentra rodeada por una estructura denominada cápsula, rica en polisacáridos y proteínas¹⁸.

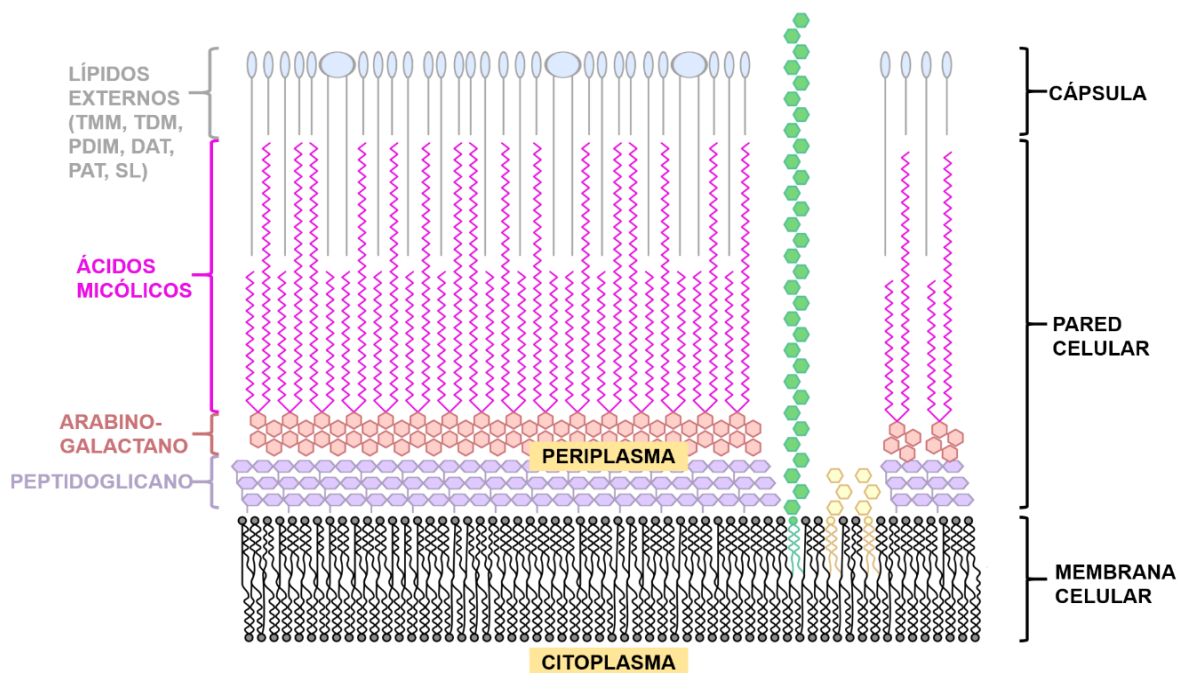


Figura 1. Representación esquemática de la envoltura celular de *M. tuberculosis*. Se muestran los ácidos micólicos unidos covalentemente a la capa de arabinogalactano (AG), a su vez unida al peptidoglicano (PG) por una unión fosfodiéster. Otros lípidos complejos libres presentes en la pared celular son acil-glicolípidos, trehalosa monomicolato (TMM), trehalosa dimicolato (TDM), tiocerol de dimicocerosato (PDIM), diacil trehalosa (DAT), pentacil trehalosas (PAT) y sulfolípidos (SL).

5 Patogénesis de la tuberculosis

La infección por *M. tuberculosis* en una persona sana comienza cuando inhala bacilos contenidos dentro de los aerosoles expelidos por un paciente con una infección activa. Entonces, la bacteria llega rápidamente al espacio alveolar dentro de los pulmones donde es captada principalmente por los macrófagos alveolares¹⁹.

M. tuberculosis es reconocida e internalizada eficientemente dentro de los macrófagos, pero, a diferencia de la mayoría de los patógenos que son destruidos luego de ser fagocitados debido a la fusión del fagosoma con los lisosomas, las micobacterias son capaces de bloquear en gran medida este proceso. Por otro lado, cuando se encuentra dentro de un fagolisosoma, a la resistencia intrínseca conferida por la gruesa y compleja envoltura celular se suma la activación de genes

que permiten enfrentar el estrés ácido y la presencia de especies reactivas del nitrógeno dentro de los mismos²⁰.

De este modo, la habilidad de arrestar la fusión del fagosoma con vesículas líticas y sobrevivir dentro de las mismas constituye una herramienta de supervivencia fundamental, estableciendo un nicho replicativo dentro del fagocito que les permite proliferar.

La respuesta inmune innata en los pulmones del hospedador es esencial para la evolución de la enfermedad, ya que la presencia del foco infeccioso desata la agregación de células inmunes. Se forma, de este modo, una estructura organizada llamada granuloma que nuclea macrófagos conteniendo a *M. tuberculosis* en el centro, rodeados por otras células blancas y revestidos por una capa de tejido conectivo. Este tipo de respuesta, aunque permite contener la infección del bacilo, no es suficiente para eliminarlo del organismo. Un sello distintivo de *M. tuberculosis* es la capacidad de permanecer enquistada dentro del centro caseoso del granuloma en una fase de dormancia que puede persistir incluso hasta por décadas²¹.

Si bien poco se sabe de las características químicas existentes en el microambiente generado dentro de estas estructuras, desde mediados del siglo pasado se ha ido postulando que la baja concentración de oxígeno en su interior es una de sus características fundamentales²². En este contexto se han desarrollado modelos *in vitro* para el estudio de *M. tuberculosis* en estado no replicativo inducido por hipoxia, en los cuales se observó que el crecimiento del organismo se ve reducido por la depleción de oxígeno²³. Para más detalle, la estructura y desarrollo del granuloma se detalla en la figura 2²⁴.

La ocurrencia de ciertas condiciones médicas como infección por HIV, diabetes, cáncer, desnutrición o envejecimiento, además de otros factores genéticos y ambientales pueden reactivar la proliferación bacteriana. Un balance de respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias es esencial para el control del crecimiento y resolución del granuloma en el tiempo. Una acumulación de tejido necrótico en su centro puede llevar al colapso y la diseminación de los bacilos a otras partes del tejido pulmonar, favoreciendo la aparición de nuevos granulomas o

la reactivación de la enfermedad. Además, su ruptura hacia el espacio alveolar puede llevar a la transmisión de *M. tuberculosis* hacia individuos sanos.

Los macrófagos infectados dentro del granuloma suelen desarrollarse en células gigantes multinucleadas (CGM) por fusión a otros macrófagos o adquirir un fenotipo conocido como macrófago espumoso (ME) caracterizado por la abundancia de cuerpos lipídicos ricos en triacilglicerol (TAG). El bacilo puede sobrevivir dentro de los ME, donde utiliza las reservas lipídicas como fuente de carbono, almacenando el exceso dentro de inclusiones lipídicas intracitoplasmáticas (ILI)²⁵. Luego de ser internalizado, *M. tuberculosis* puede acceder a estos nutrientes mediante la fusión de los fagosomas con los cuerpos lipídicos del hospedador²⁶. Asimismo, la relación entre el estado de dormancia y reactivación de la infección se ha relacionado con el estado de las ILI dentro de la célula. Mientras que tanto la entrada en latencia como el aumento de ILI son estimuladas por el ambiente de hipoxia existente dentro del granuloma^{23,27}, se observó que un nuevo aumento en los niveles de oxígeno promueve la movilización y depleción de TAG dentro de las ILI, lo que se traduce en una nueva replicación activa de las bacterias^{28,29}. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la relación existente entre los cuerpos lipídicos del hospedador y *M. tuberculosis* recién están comenzando a dilucidarse.

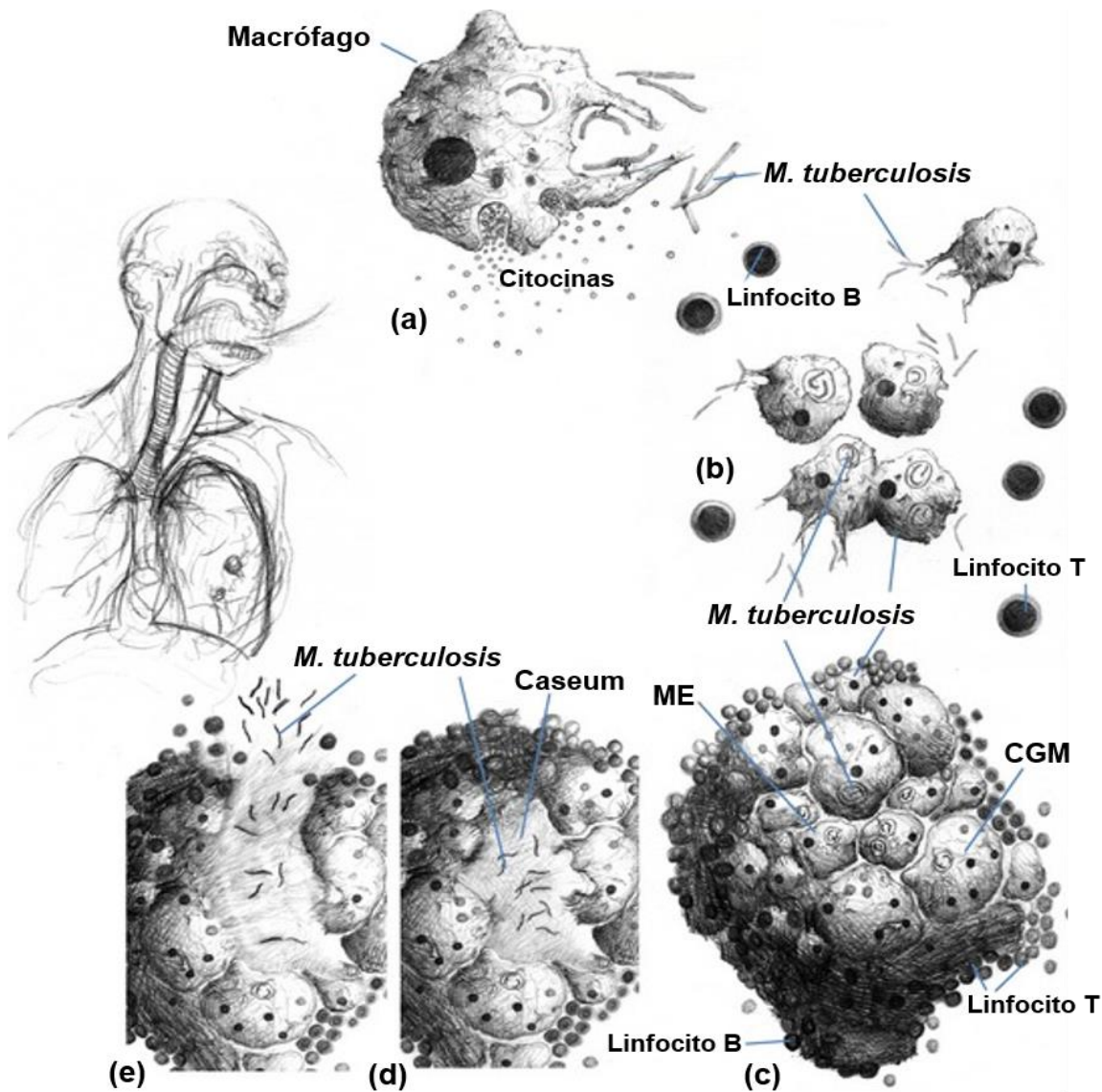


Figura 2. Formación y desarrollo del granuloma en humanos. Luego de la inhalación de aerosoles contaminados *M. tuberculosis* llega a las vías respiratorias bajas, donde es reconocida y fagocitada por los macrófagos alveolares. Este reconocimiento desata la producción de citoquinas (a) que favorecen el reclutamiento de más macrófagos, células dendríticas y linfocitos al sitio de la infección (b) Se forma así el granuloma, una estructura enquistada con macrófagos infectados, que pueden diferenciarse en macrófagos espumosos (ME) o células gigantes multinucleadas (CGM); rodeado de linfocitos y otras células blancas. (c) Al reactivarse el crecimiento de *M. tuberculosis*, provoca la muerte de los macrófagos (d) y junto al material necrótico en aumento puede producir el colapso del granuloma y la diseminación de los bacilos a otros tejidos o a las vías respiratorias (e). (Extraído de Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F. & Altare, F. (2012) The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 139127.)

En la progresión de la enfermedad en el ser humano, la formación del granuloma transcurre brevemente luego de la infección inicial, sin embargo, la forma activa de la infección pulmonar raramente se da por la reactivación de los bacilos dentro del mismo en etapas tempranas. La mayoría de los casos evoluciona a partir de bacterias durmientes de granulomas latentes durante años³⁰ en los cuales existe aproximadamente 10 % de probabilidad de que el paciente desarrolle la forma activa de la infección durante algún momento de su vida.

6 Metabolismo del nitrógeno y su rol en la virulencia

Al igual que en otras bacterias, *M. tuberculosis* asimila nitrógeno en forma de amonio incorporándolo como glutamato y glutamina, que funcionan como principales dadores de nitrógeno para la síntesis de otras moléculas³¹. Sin embargo, puede hacer uso de una gran variedad de fuentes de nitrógeno, ya sean orgánicas (como aminoácidos) como inorgánicas^{32,33}. Algunas de estas moléculas cumplen un rol diferente, al tener la capacidad de reemplazar al oxígeno como aceptores finales de electrones de la cadena respiratoria³⁴. Dentro de éstas últimas, se han estudiado más extensivamente el uso de nitrato y nitrito; principalmente en contexto de resistencia al estrés por hipoxia.

NarK2 es el mayor transportador de nitrato, que luego de su ingreso a la célula, es reducido a nitrito por el complejo enzimático nitrato reductasa NarGHJI y posteriormente a amonio por el complejo nitrito reductasa NirBD³⁴. A su vez, tanto NarK2 como la reductasa NarGHJI tienen su expresión aumentada en medios hipóxicos^{35,36}, lo que sugeriría un rol esencial en la utilización de nitrato como aceptor final de la cadena respiratoria en carencia de oxígeno. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la presencia de nitrato aumenta la supervivencia de *M. tuberculosis* al descender abruptamente los niveles de oxígeno *in vitro*³⁷. Sorprendentemente se ha postulado a NarK2 como el punto de regulación de este metabolismo, ya que podría responder al estado redox conferido por la ausencia de oxígeno³⁸, y permitir el ingreso de nitrato a la célula. La ruta de reducción del nitrato se detalla en la figura 3.

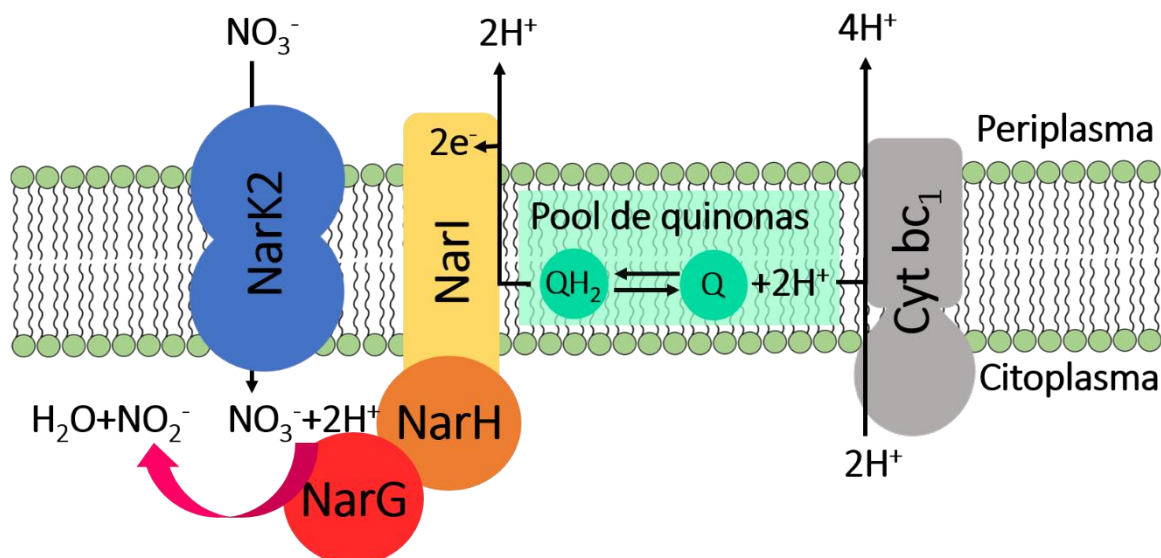


Figura 3. Respiración de nitrato en *Mycobacterium*. En la imagen se muestra la disposición de la cadena de transportes de electrones en la membrana plasmática. La enzima nitrato reductasa NarGHJI está compuesta de tres subunidades: una subunidad α catalítica (NarG), una subunidad β (NarH) y una subunidad quinol oxidasa γ (NarI). Las subunidades α y β están ancladas en el lado citoplasmático de la membrana por la subunidad γ . La enzima utiliza el pool de quinona (Q) como dador de electrones generando una fuerza protón motriz. NarI oxida el quinol y libera dos protones al periplasma. Los electrones son pasados de NarI a NarG a través del centro Fe-S de NarH para reducir el nitrato, con el consumo de dos protones citoplasmáticos. (adaptado de Khan, A. & Sarkar, D. (2012) *Nitrate reduction pathways in mycobacteria and their implications during latency*. Microbiology 158, 301–307)

Una de las defensas primarias utilizadas por las células inmunes (como los macrófagos) para el combate de patógenos es la producción de óxido nítrico por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual es inducida por el estímulo inflamatorio, como el interferón- γ (IFN- γ), y convierte l-arginina en citrulina y óxido nítrico. Este radical libre y sus intermediarios son altamente tóxicos para un gran rango de macromoléculas de los patógenos, incluyendo el ADN y las proteínas³⁹ y juega un rol importante en la respuesta contra *M. tuberculosis*. De hecho, una característica destacable del bacilo es su capacidad de oxidar las especies reactivas del nitrógeno para su subsecuente utilización como nitrato dentro del fagosoma; posiblemente debido a la presencia de hemoglobinas truncadas que cumplen funciones de detoxificación y regulación del estado redox en la célula⁴⁰.

En macrófagos humanos la expresión de iNOS y el consiguiente aumento de la producción de óxido nítrico que ocurre luego del tratamiento con IFN- γ , L-arginina y cofactores para la síntesis de estos radicales libres, se correlacionan con un incremento en la tasa replicativa de *M. tuberculosis* que depende de la subunidad reductora NarG⁴¹. A su vez, la producción de nitrito intracelular por parte de la enzima NarGHJl tiene un efecto inductor de muchos genes relacionados con el ahorro metabólico (bajo consumo de ATP) y resistencia a varios tipos de estrés⁴². Esto sugiere que la bacteria no sólo puede utilizar el nitrato generado a partir del óxido nítrico, sino que también le sería beneficioso para tolerar el estrés producido por los medios ácidos e hipóxicos dentro de los fagosomas de macrófagos. Esto conlleva a un enorme aumento de la capacidad de supervivencia del microorganismo dentro del hospedador. Por lo expuesto, el estudio del metabolismo de nitrato y nitrito en el género *Mycobacterium* es de suma importancia no solo por el conocimiento básico de este metabolismo, sino también por su rol en la virulencia. Estudios más profundos relacionado con los aspectos regulatorios de este metabolismo podrían ser importantes para desarrollar estrategias que permitan atacar al patógeno en su entrada al estado de latencia.

7 Regulación de los metabolismos de nitrógeno y carbono en *actinomyces*.

Estudios previos han identificado y caracterizado en *Rhodococcus jostii* un regulador transcripcional denominado como NlpR (nitrogen lipid regulator), el cual se encuentra conservado en bacterias del orden *actinomyces*⁴³, grupo que engloba tanto a *R. jostii* como a las bacterias del género *Mycobacterium*. El alineamiento de secuencias utilizando el algoritmo ClustalW, muestra la homología de los ortólogos de NlpR en diversos miembros del orden *actinomyces* con un alto porcentaje de cobertura de secuencia (>95 %) y de identidad (>50 %). En la figura 4 se muestran los alineamientos de secuencias de NlpR de organismos pertenecientes al orden *actinomyces* a través del algoritmo ClustalX.

Estudios *in silico* predicen que la proteína sintetizada a partir de este gen posee dos dominios conservados: La región N-terminal es predicha como un

dominio enzimático similar a las uroporfirógeno-III sintetas (HemD), que cataliza la formación de uroporfirógeno III a partir de hidroximetilbilano como parte de la síntesis de compuestos derivados de pirroles; mientras que el extremo C-terminal es similar a los motivos de unión al ADN de los reguladores de respuestas similares a OmpR.

En *R. jostii* se ha reportado que la privación de nitrógeno produce un incremento de hasta un 60 % (peso celular seco) de triacilglicerol (TAG), empleando una gran variedad de fuentes de carbono^{44,45}. En este organismo el regulador NlpR (codificado por el gen *RHA1_RS31140*) aumenta significativamente su expresión en medios pobres en nitrógeno y activa la síntesis de genes relacionados a la biogénesis de TAG y asimilación de nitrógeno.

Una mutación en el gen *nlpR* provoca una disminución de la capacidad de síntesis de TAG aún en medios pobres en nitrógeno. Por otro lado, los niveles de NlpR en medios ricos en nitrógeno, que promueven crecimiento de la célula, pero no la acumulación de TAG, son despreciables.

Finalmente, se ha comprobado en el mismo estudio, la capacidad de NlpR de unirse a las regiones promotoras de ciertos genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y otros pertenecientes a la vía Kennedy para la síntesis de TAG. Dentro de la síntesis de ácidos grasos, los genes en cuestión corresponden a las sintetas de ácidos grasos FASI (*fasI*) y FASII (*mabR* y *pccB*), mientras que en la vía Kennedy de síntesis de TAG los genes regulados por NlpR corresponden a las enzimas 1-ácil-glicerol-3-fosfato O-áciltransferasa *plsC* (AGPAT), ácido fosfatídico fosfatasa (*pap2*) y 1,2-diacilglicerol aciltransferasa *atf3* (DGAT)⁴³. Por lo expuesto, NlpR ha sido postulado como un regulador transcripcional pleiotrópico que conecta los metabolismos del nitrógeno y carbono en *R. jostii*.

A su vez, un ortólogo de este regulador transcripcional fue caracterizado en *Streptomyces coelicolor*, otro miembro del orden *actinomycetales*, y nombrado como NnaR (nitrate/nitrite assimilation regulator). Sin embargo, la función reguladora que desempeña en esta especie (codificado por el gen *SCO2958*) es diferente a la caracterizada en *Rhodococcus*. Estudios fisiológicos realizados en la

mutante en este gen sugieren principalmente un rol en la reducción del nitrito⁴⁶ al poder unirse a la región promotora del gen de la enzima nitrito reductasa *nirB*. En *S. coelicolor* NnaR se encuentra dentro del regulón de GlnR⁴⁶, un regulador de respuesta central de los genes involucrados en el metabolismo del nitrógeno^{47,48}, particularmente en su asimilación a partir de diversas fuentes orgánicas e inorgánicas.

El ortólogo de este regulador en *M. smegmatis*, codificado por el gen MSMEG_0432, aún no ha sido caracterizado; sin embargo, se conoce que también forma parte del regulón de GlnR, que actúa en respuesta a los niveles de nitrógeno en el ambiente⁴⁹.

En la figura 5 se muestra el contexto genómico del gen codificante para NlpR en distintas bacterias del orden *actinomycetales*.

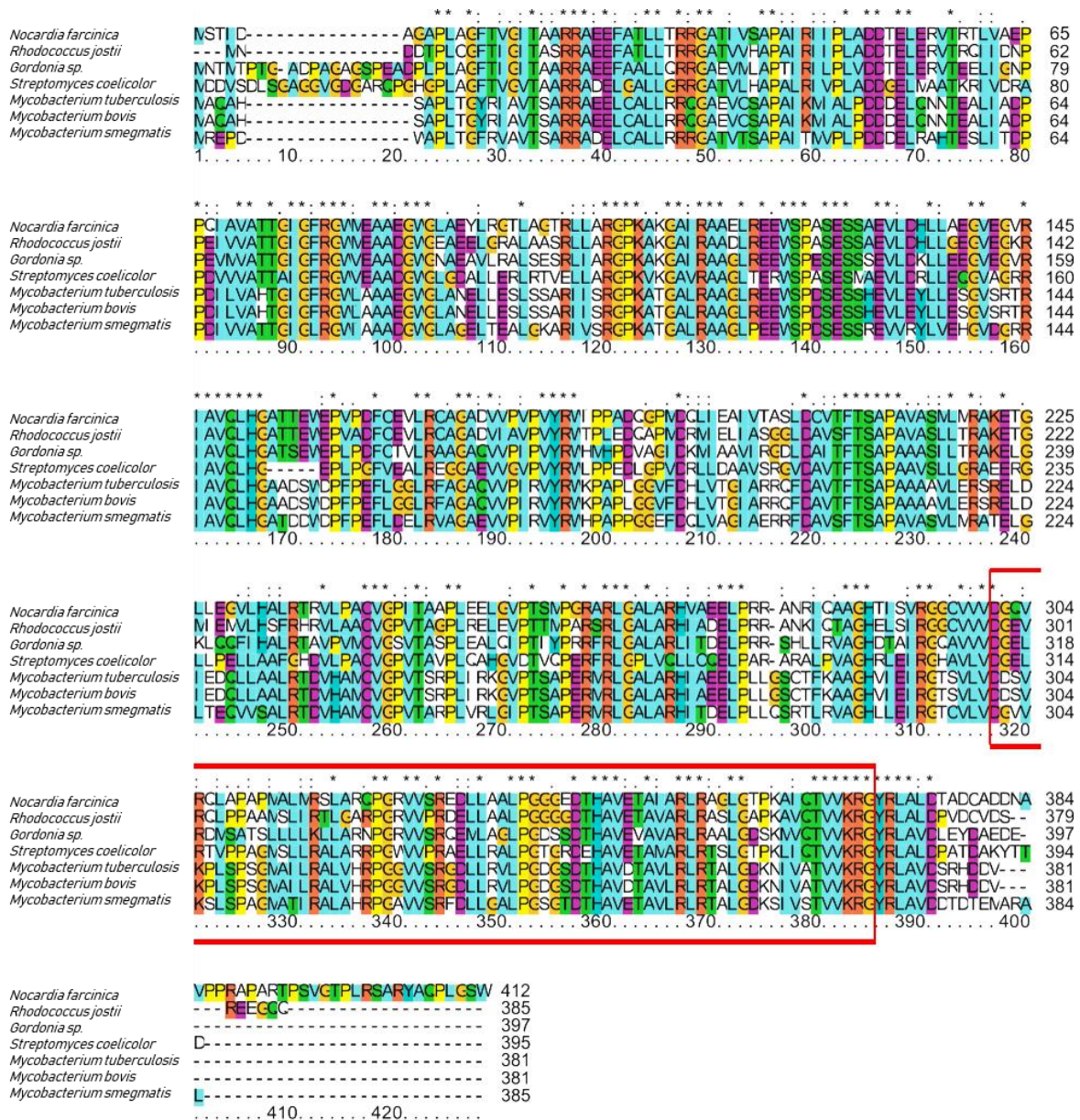


Figura 4. Alineamiento múltiple de secuencias de ortólogos de NlpR en organismos del orden *actinomycetales*. En la figura se muestran las secuencias de los ortólogos de NlpR, el cuadro rojo indica la región predicha como motivo de unión al ADN (Analizado a través del programa ClustalX)

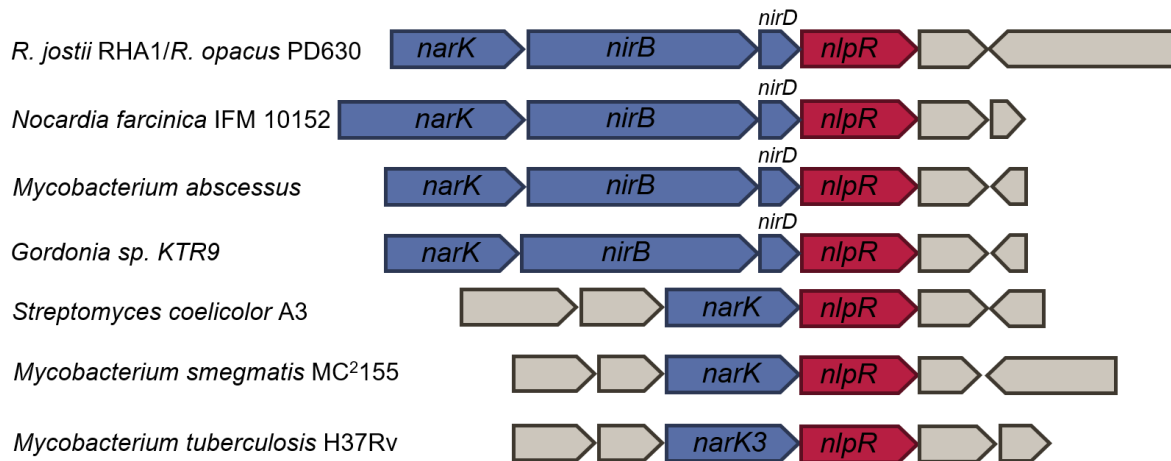


Figura 5. Organización genética de los genes del metabolismo de nitrógeno. Se muestran en la figura, la disposición del gen codificante de *nlpR* y otros genes de metabolismo del nitrógeno. *NirB* y *NirD* codifican para las subunidades mayor y menor de la enzima nitrito reductasa respectivamente. *NarK/NarK3* codifican genes para la asimilación de nitrato/nitrito.

Objetivos

El estudio y caracterización del regulador transcripcional NlpR en diversos miembros de orden *actinomycetales* mostró su relación directa con el metabolismo del nitrógeno al activar la transcripción de las enzimas implicadas en la asimilación y reducción de nitrógeno inorgánico. Sin embargo, en *Rhodococcus*, la regulación por NlpR se extiende además al metabolismo de carbono, al activar la transcripción de genes tanto de la síntesis de ácidos grasos como de la síntesis de TAG. Por lo tanto, en este último caso, y debido a que los niveles de este regulador se ven incrementados en medios carentes de nitrógeno, se lo postuló como un regulador transcripcional pleiotrópico que mediaría los metabolismos de ambos nutrientes.

Teniendo en cuenta:

- La relevancia de la acumulación de lípidos neutros tales como TAG, en *Mycobacterium tuberculosis* y su relación con la entrada en latencia en el hospedador.

- La capacidad de la bacteria para oxidar a nitrato especies reactivas del nitrógeno producido por macrófagos.

- La utilización de nitrato/nitrito como aceptores alternativos para la respiración en el ambiente hipóxico del granuloma.

Y considerando que las estrategias mencionadas son de vital importancia para la virulencia, persistencia y reactivación de la enfermedad en el ser humano, el presente proyecto de tesina plantea como objetivo principal la caracterización del ortólogo del gen codificante para el regulador transcripcional NlpR (MSMEG_0432) en el organismo modelo *M. smegmatis*.

Con tal fin se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1. Construir una mutante en el gen MSMEG_0432**
- 2. Estudiar el crecimiento de dicha mutante en medios con distintas fuentes y concentraciones de nitrógeno.**
- 3. Analizar la producción de TAG en dicha mutante.**

Materiales y Métodos

1 Cepas bacterianas y plásmidos

Todos los clonados realizados para la construcción de los vectores del presente proyecto fueron llevados a cabo en la cepa de *Escherichia coli* DH5- α .

La construcción de mutantes, los estudios de perfiles de crecimiento y TLC fueron realizados en *M. smegmatis* mc²155, una cepa mutante de *M. smegmatis* mc²6⁵⁰. En este trabajo de tesina, *M. smegmatis* mc²155 es referida como cepa salvaje de *M. smegmatis*.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo de tesina.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> DH5α	<i>E. coli</i> K12 F ⁻ Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR supE44 thi-1λ⁻ gyrA96 relA1</i>	51
<i>M. smegmatis</i> mc²155	Cepa de <i>M. smegmatis</i> de alta eficiencia de transformación, mutante <i>ept</i> de <i>M. smegmatis</i> mc ² 6	50
<i>M. smegmatis</i> ΔnlpR	Cepa de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con una deleción en fase en el gen MSMEG_0432	Esta tesina
<i>M. smegmatis</i> ::pJC0432	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con pJC0432 integrado al genoma.	Esta tesina
<i>M. smegmatis</i> ::pSM128	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 con pSM128 vacío integrado al genoma.	Esta tesina
<i>M. smegmatis</i> ΔnlpR::pJC0432	<i>M. smegmatis</i> Δ nlpR con pJC0432 integrado al genoma y el plásmido MT13 episomal	Esta tesina

Tabla 2. Plásmidos utilizados en el presente trabajo de tesina.

Plásmido	Genotipo relevante y/o información	Referencia
pJET1.2 (Thermo Fisher)	Vector de clonado de extremos romos para productos de PCR. Selección positiva de transformantes con inserto por interrupción de gen letal en SMC, Ap ^{r52}	Thermo Fisher
pPR27	Vector con origen de replicación para <i>E. coli</i> (<i>oriE</i>) y <i>Mycobacterium</i> (<i>oriM temp^s</i>), <i>sacB</i> , <i>xylE</i> , Gm ^r	53
pSM128	Vector integrativo de <i>Mycobacterium</i> para complementación, por clonado en el sitio único <i>Scal</i> , que contiene el gen de la integrasa del micobacteriófago L5 (<i>int</i>), Sm ^r /Sp ^r	54
pCK11	Vector derivado de pJET integrando en su SMC el promotor micobacteriano P _{smyc} que contiene la región operadora <i>tetO</i> para unión del represor TetR, Ap ^r	-
pMT13	P _{smyc} - <i>tetR</i> digerido con <i>SacII</i> and <i>EcoRI</i> a partir de FRA42B y clonado en pMP349, Am ^r	-
pET28-a	Vector fagémido (Km ^r <i>lacZ'</i>) para expresión de proteínas recombinantes bajo el promotor <i>T7</i> que permite la fusión a 6 residuos de histidina N-terminales	Novagen
pJD0432	Vector derivado de pPR27 que contiene dentro de los sitios <i>XhoI</i> y <i>SpeI</i> el alelo delecionado de MSMEG_0432 (135 pb) con ~800 pb adyacentes a ambos lados del mismo. <i>oriM temp^s</i> , <i>sacB</i> , <i>xylE</i> , Gm ^{r53}	Esta tesina
pJC0432	Vector derivado de pSM128 que contiene dentro del sitio de clonado único <i>Scal</i> , una copia de MSMEG_0432 salvaje bajo el promotor regulable por el sistema Tet-ON. Sm ^r	Esta tesina

Ap^r, resistencia a ampicilina; Am^r, resistencia a apramicina; Gm^r, resistencia a gentamicina; Sm^R, resistencia a estreptomina; Sp^r, resistencia a espectinomicina.

2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano.

2.1 Medios de cultivo para *E. coli*

El crecimiento de *E. coli* durante los clonados se realizó en medio líquido Luria Bertani (LB) o bien en medio sólido Luria Bertani – agar 2 % m/v (LBA) para aislamiento o repicado de colonias.

2.2 Medios de cultivo para *M. smegmatis*

Para el crecimiento de *M. smegmatis* en cultivo líquido se utilizó medio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con glicerol 0,2 % v/v y Tyloxapol 0,03 % v/v. Cuando se indica, para los experimentos de crecimiento, se utilizó medio Sauton modificado (medio mínimo) suplementado con glicerol 0,2 % v/v y Tyloxapol 0,015 % v/v. Para el crecimiento en medio sólido se utilizó LBA. Para la contraselección utilizando el marcador *sacB* se suplementó el medio sólido con sacarosa 10 % m/v.

Para preparar inóculos de las distintas cepas de *M. smegmatis* se inoculó una colonia aislada en medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 y se incubó con agitación constante (220 rpm) a 37 °C. Del cultivo saturado (hasta 3-7 días para *M. smegmatis*) se diluyó 1:200 en medio fresco y se incubó nuevamente hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,8-1, donde el cultivo se encuentra en fase exponencial; fraccionado luego de a 1 mL en tubos de microcentrífuga y almacenados a -80 °C. Estas fracciones fueron utilizadas posteriormente para inocular cultivos en los experimentos de crecimiento en medios mínimos y análisis de síntesis de lípidos. En ningún caso el volumen de medio de cultivo superó la quinta parte del recipiente. La concentración final de los antibióticos empleados para el cultivo de los diferentes microorganismos se detalla en la Tabla 3.

2.3 Composición de los medios

Luria Bertani (LB) ⁵⁵: 10 g Peptona de caseína, 5 g Extracto de levadura, 5 g NaCl, y 1 L H₂O. Llevar a pH 7 con NaOH.

Middlebrook 7H9 (Difco): 4,7 g polvo (0,5 g Sulfato de amonio, 0,5 g Ácido L-glutámico, 0,1 g Citrato de sodio, 1 mg Piridoxina, 0,5 mg Biotina, 2,5 g Fosfato disódico, 1 g Fosfato monopotásico, 0,04 g Citrato de amonio férrico, 0,05 g Sulfato de magnesio, 0,5 mg Cloruro de calcio, 1 mg Sulfato de zinc, 1 mg Sulfato de cobre), y 900 mL H₂O.

Sauton modificado: 0,45 g Fosfato monopotásico, 0,95 g Sulfato de magnesio heptahidratado, 1,8 g Ácido cítrico, 0,045 g Citrato férrico, 0,0009 g Sulfato de zinc y 900 mL H₂O. Llevar a pH 7 con NaOH.

Tabla 3. Concentración de los antibióticos empleados.

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>
Ampicilina (Ap)	100 µg/mL	-
Kanamicina (Km)	50 µg/mL	15 µg/mL
Gentamicina (Gm)	20 µg/mL	5 µg/mL
Apramicina (Am)	50 µg/mL	50 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	-	20 µg/mL
Espectinomicina (Sp)	100 µg/mL	-

3 Transformación de las cepas bacterianas

3.1 Transformación de *E. coli*

Las células de *E. coli* se transformaron de acuerdo a Sambrook y colaboradores⁵⁵. Para esto, 10 mL de un cultivo crecido a 37 °C hasta fase exponencial (DO_{600} 0,5) fueron recolectadas por centrifugación (10 min, 2000 *g*, 4 °C). Las células correspondientes a 1 mL de cultivo se lavaron con 0,5 mL de Solución 1 de transformación estéril (MOPS 10 mM pH 7 y KCl 10 mM). Posteriormente se resuspendieron en 0,5 mL de Solución 2 (MOPS 100 mM pH 6,5, $CaCl_2$ 50 mM, KCl 10 mM) y se incubaron 15 min a 4 °C, tras lo cual las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en 0,1 mL de Solución 2.

Para las transformaciones se agregaron 1-200 ng de ADN en un volumen menor a 10 μ L, y la mezcla fue incubada 30 min a 4 °C. El choque térmico fue realizado durante 1 min a 42 °C. Las células se recuperaron a 37 °C en 1 mL de medio LB durante 1 h. Las transformantes fueron sembradas en medio LBA con los antibióticos apropiados para su selección.

3.2 Transformación de *M. smegmatis*

50 mL de un cultivo fresco de *M. smegmatis* crecido en medio 7H9 hasta fase logarítmica (DO_{600} 0,8-1) fue incubado durante 20 min en hielo. Las células se recolectaron por centrifugación (10 min, 2000 *g*, 4 °C) y fueron lavadas dos veces con 1 volumen de glicerol 10 % v/v estéril y frío. Posteriormente el precipitado celular se resuspendió en 1:10 del volumen inicial de glicerol 10 % v/v frío y se dividió en alícuotas de 400 μ L cada una para ser conservadas a -80 °C.

Para la transformación, las células se incubaron a 4 °C con aproximadamente 1 μ g de ADN durante 10 min, en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (BioRad). La electroporación se realizó a un pulso de 2,5 kV, 25 μ F y 1000 Ω , e inmediatamente después las células se recuperaron en 3 mL de medio LB con

agitación a 37 °C, durante 3 h. Las transformantes se seleccionaron por siembra en placas de LB agar con los antibióticos correspondientes, e incubación a 37 °C durante 5-7 días.

4 Manipulación de ADN

4.1 Tratamiento con enzimas de restricción y ligación de ADN

El tratamiento del ADN con enzimas de restricción, fosfatasa alcalina y T4 ADN ligasa, se realizó según Sambrook y colaboradores⁵⁵ y siguiendo las recomendaciones de los manuales de los proveedores de las enzimas utilizadas.

4.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa se realizó según Sambrook y colaboradores⁵⁵. Se utilizaron concentraciones de agarosa entre 0,7-2 % m/v, según el tamaño de los fragmentos a separar, y solución TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM) para la preparación y corrida de los mismos. Las muestras se mezclaron con solución de siembra (azul de bromofenol 0,25 % m/v, xilenecianol 0,25 % m/v y 30 % v/v glicerol) y la corrida electroforética se realizó a corriente constante de 90 mA. Los fragmentos de ADN fueron visualizados por tinción con Bromuro de etidio y visualización en un transiluminador con luz ultravioleta (excitación a 210 nm).

4.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN resultantes de las digestiones enzimáticas fueron purificados con el kit GFX (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4 Secuenciación de nucleótidos y análisis de secuencias

Para la determinación de la secuencia de fragmentos de ADN se utilizó el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (DNA Sequence Facility-UMaine, Maine, USA).

4.5 Extracción de ADN genómico de *M. smegmatis*

Las células de 10 mL de un cultivo de *M. smegmatis* (DO₆₀₀ 0,8-1) se recolectaron por centrifugación (2000 g, 20 min). El precipitado celular se lavó con 1 mL de solución GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8 y EDTA 10 mM) y se resuspendió en 450 µL de la misma. Se agregaron 50 µL de lisozima 10 mg/mL y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, a la suspensión se le adicionó 100 µL de SDS 10 % m/v y 50 µL de proteinasa K 10 mg/mL, y se incubó durante 30 min a 55 °C. Posteriormente, se le agregó 330 µL de H₂O y 410 µL NaCl 5 M, se agitó por inversión y se centrifugó durante 15 min a 10000 g. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se trató dos veces con un volumen de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclando y centrifugando en cada etapa 10 min a 10000 g. El ADN se precipitó a partir de la fase acuosa recuperada tras el último paso de centrifugación, mediante el agregado de 0,7 volúmenes de isopropanol e incubación de la muestra a -20 °C durante toda la noche. El precipitado de ADN se recuperó por centrifugación (15000 g, 20 min, 4 °C) y se lavó con 500 µL de etanol 70 % v/v frío. Finalmente, el ADN obtenido se resuspendió en 50 µL de agua milli-Q estéril y se incubó un día en heladera para su completa solubilización. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.6 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*.

Los plásmidos utilizados se purificaron utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L, utilizando 20 pmol de cada oligonucleótido cebador y aproximadamente 5 pmol de ADN molde. Se emplearon las enzimas ADN polimerasa Taq, Pfu (Pegasus) o Q5 (New England Biolabs) siguiendo las indicaciones del proveedor. La reacción consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; 30 ciclos de desnaturalización (30-45 s, 94 °C), anillado (30-45 s a la temperatura correspondiente al par de cebadores empleados) y polimerización (aproximadamente 1 min por cada kilobase de fragmento a amplificar, 72 °C); y una extensión final de 10 min a 72 °C.

6 PCR de colonia

Para el ensayo en *E. coli* la colonia a analizar se resuspende en 50 μ L de agua y se calienta a 95 °C por 15 minutos. Para la mezcla de la PCR se utilizan entre 2 y 5 μ L de dicha preparación como ADN molde para la reacción.

Para el ensayo en *M. smegmatis* se resuspende la colonia en una solución tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM con 0,2 g de partículas de zirconio. Se agita en vortex enfriando con hielo por 2 minutos y luego se incuba a 95 °C por 15 minutos. Para la mezcla de PCR se añaden entre 2 y 5 μ L de dicha preparación como ADN molde.

7 Construcción de plásmido

pJD0432. Para la construcción de la delección de MSMEG_0432 se diseñaron dos pares de oligonucleótidos:

F-Dup0432 (5'TGTACATGGACAACCTCGAGCATCACAAGA3') y R-Dup0432 (5'GAATTCATCGGCTCGTCGGGCGGA3') que por PCR amplifican un fragmento de ADN de 886 pb del genoma de *M. smegmatis*, que incluyen 810 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción putativo de MSMEG_0432 más 72 pb del extremo 5' de su región codificante; introduciendo a su vez, en los extremos de dicho fragmento, dos sitios de restricción, *Xho*I y *Eco*RI respectivamente. Este fragmento se llamará Dup0432

F-Ddown0432 (5'GAATTCAAAAGGGGTTATCGGCTGGCGGT3') y R-Ddown0432 (5'ACTAGTTCGTTTCTGAACCTGGTCGGCACTG3') que por PCR amplifican un fragmento de ADN de 1107 pb del genoma de *M. smegmatis*, que incluyen 60 pb del extremo 3' de la región codificante de MSMEG_0432 más 1036 pb corriente abajo del codón de terminación de MSMEG_0432; introduciendo a su vez, en los extremos de dicho fragmento, dos sitios de restricción, *EcoRI* y *SpeI* respectivamente. Este fragmento se llamará Ddown0432

Una vez clonados ambos fragmentos en el vector pJET, su secuencia y correcta orientación dentro del plásmido fueron corroboradas por secuenciación.

Acto seguido digiriendo ambos vectores con *XhoI* y *EcoRI* se subclonó el fragmento Dup0432 dentro del vector que contenía a Ddown0432 con su fragmento *EcoRI* contiguo al sitio *XhoI* propio del SMC del pJET, permitiendo así la construcción de un fragmento de ADN de 1965 pb que posee, unido por el sitio *EcoRI* 135 pb de las regiones 5' y 3' de MSMEG_0432 con una delección de 1023 pb comparado con el alelo salvaje, flanqueadas por sus regiones adyacentes.

El esquema de la construcción del plásmido pJD0432 se detalla a continuación en la figura 6.

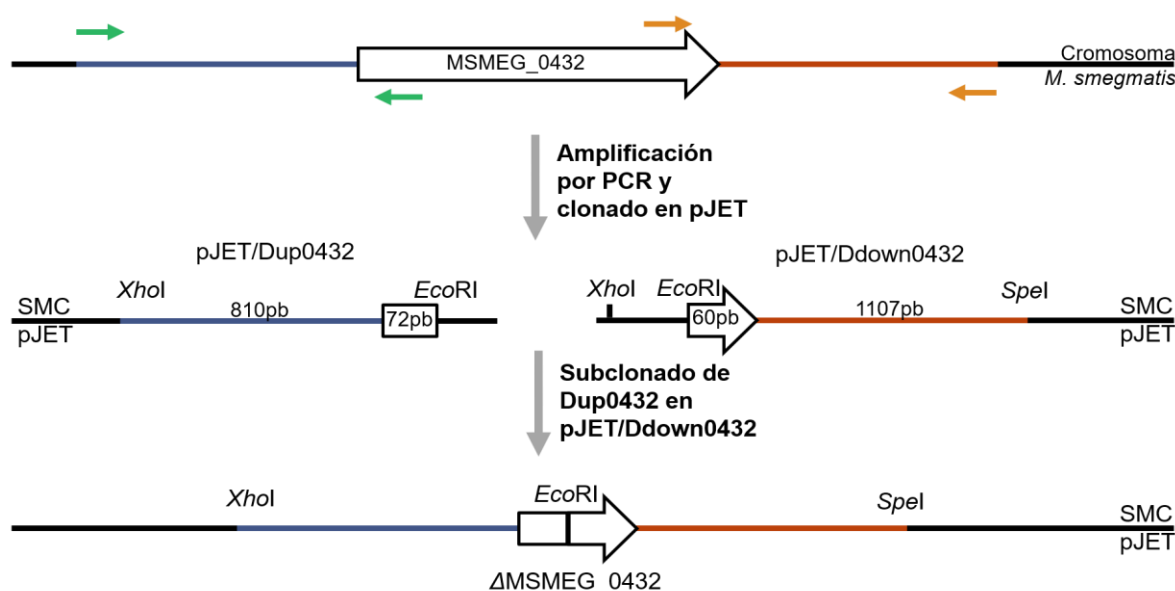


Figura 6. Esquema de la construcción del vector pJD0432. Las regiones 5' y 3' fueron amplificadas por PCR y clonadas independientemente (las regiones de hibridación de los

oligonucleótidos se detallan con flechas coloreadas). Luego el fragmento 5' fue subclonado dentro del vector que contenía el fragmento 3' a través de los sitios de restricción mencionados en la figura.

pJC0432. Para su construcción se diseñaron dos oligonucleótidos:

F-M0432 (5'GCTAGCAGCATGCGTGAGCCCGACTG3') y R-M0432 (5'GAATTCAACGCGCGTGCCATCTCT3'). Ambos amplifican por PCR el alelo salvaje de MSMEG_0432 al utilizar ADN genómico de *M. smegmatis* como molde. De este modo se amplifica un fragmento de 1138 pb introduciendo los sitios de restricción *NheI* y *EcoRI* a ambos extremos del mismo. Este inserto es clonado en el vector pJET y utilizando los sitios de corte *NheI* y *EcoRI*, es subclonado en el vector pET28-a. Acto seguido, utilizando los sitios *NdeI* (presente en el SMC del pET28-a) y *EcoRI* se transfirió este inserto al vector pCK11, quedando así la copia salvaje del gen MSMEG_0432 bajo el control del promotor P_{smyc} con la región operadora *tetO*, a la que se une el regulador TetR. Finalmente, esta construcción del promotor y el gen corriente abajo fue transferida al vector integrativo pSM128 utilizando las enzimas *EcoRV* y *Scal* respectivamente, siendo esto posible ya que ambas enzimas dejan extremos romos.

8 Ensayos de crecimiento

Se inocularon a tiempo cero 250 μ L de cultivo a DO_{600} 0,5-1 de la cepa de *M. smegmatis* en estudio en frascos Erlenmeyer conteniendo 50 mL de medio Sauton estéril suplementado con la concentración correspondiente de nitrato de potasio, nitrito de sodio o cloruro de amonio según el caso, como única fuente de nitrógeno.

En todos los casos, los cultivos fueron incubados a 37 °C con agitación constante de 220 rpm.

Los puntos de las curvas fueron tomados midiendo DO_{600} en intervalos de entre 2 a 3 horas, siguiendo el crecimiento del cultivo por un período de aproximadamente 60 horas (fase estacionaria). Cada condición ensayada fue realizada por triplicado, mostrando total reproducibilidad; y las curvas observadas en los resultados son producto de la superposición de dos curvas realizadas en las mismas condiciones, con un desfase de 8 horas, para poder medir la DO_{600} a lo

largo de la progresión de toda la curva. No se muestran las correspondientes barras de error para no impedir la correcta visualización de las curvas.

9 Cromatografía en capa delgada (TLC)

La biosíntesis de TAG se evaluó en distintos puntos de la curva de crecimiento del cultivo. Para ello, se tomó un volumen de células de cultivo correspondientes a 5 mL de un cultivo a DO_{600} 1 y se centrifugaron por 10 min, 2000 *g* a 4 °C. Al pellet se lo trató con el método reportado por Bligh & Dyer⁵⁶ para la extracción de lípidos neutros. El extracto lipídico se sometió a TLC en una placa de silica gel (silica gel 60 F254; Merck) utilizando cloroformo como solvente de siembra y una mezcla de hexano:dietiléter:ácido acético (75:25:1 v/v) como solvente de corrida. El revelado de la placa se realizó rociándola con solución de sulfato de cobre y calentando en estufa a 100 °C.

10 Ensayo de la síntesis *de novo* de lípidos

La biosíntesis de TAG *de novo* se analizó por incorporación de [¹⁴C]-acetato. Se marcó 1 mL de cada cultivo con [¹⁴C]-acetato (59 mCi/mmol) (New England Nuclear) a una concentración de 1 µCi/mL. Luego de una hora de incubación, las células fueron recolectadas y los lípidos extraídos, procesados y sometidos a una cromatografía en capa delgada según el protocolo ya descrito. Los autoradiogramas se obtuvieron por exposición de los cromatogramas a placas toda la noche y se escanearon y digitalizaron con un escáner Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

Resultados

1 Construcción de la mutante en el gen MSMEG_0432 de *M. smegmatis*

Para la obtención de la cepa mutante *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ se transformó un cultivo de *M. smegmatis* mc² 155 con el vector pJD0432 según el protocolo descrito. Las células fueron sembradas en LBA en presencia de Gm a 37 °C para seleccionar las células transformantes.

Para la selección del primer evento de recombinación las colonias obtenidas en el paso anterior fueron crecidas en medio Middlebrook 7H9 líquido a 37 °C y sembradas en placas de LBA en presencia de Gm a 42 °C (temperatura no permisiva para la replicación episomal de pJD0432) seleccionando así las células transformantes con el plásmido integrado al cromosoma. La presencia de pJD0432 en cada colonia fue confirmada por la coloración amarilla luego de rociarlas con catecol (conferida por la reacción enzimática del producto del gen *xyIE* en el vector). La especificidad del primer evento de recombinación en el locus del alelo WT fue determinada por PCR de colonia.

Para la selección del segundo evento de recombinación las colonias con el primer evento exitoso fueron crecidas nuevamente en medio Middlebrook 7H9 a 42 °C en ausencia de Gm para favorecer la pérdida del plásmido integrado y sembradas en medio solido a 42 °C en LBA suplementadas con sacarosa 10 % m/v (la presencia del gen *sacB* en el vector confiere sensibilidad a la misma). Las colonias obtenidas fueron rociadas con catecol para confirmar la eliminación del plásmido y las colonias blancas fueron analizadas por PCR de colonia para verificar el reemplazo alélico.

Como el segundo evento de recombinación puede dar lugar a la eliminación del plásmido manteniendo el alelo salvaje de MSMEG_0432 o dar lugar al reemplazo por la versión delecionada del gen, la búsqueda de la mutante *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ luego de la selección del segundo evento fue llevada a cabo por PCR de colonia utilizando cebadores adecuados que hibriden a ambos extremos del locus de MSMEG_0432. De tal manera que el alelo salvaje genere un fragmento

de 2195 pb mientras que el alelo deletado uno de 1177 pb. Los productos de PCR de colonia se observan en la figura 7.

Las colonias con deleciones en el gen MSMEG_0432, confirmadas en el paso anterior, fueron seleccionadas para su fraccionamiento y uso posterior como la cepa *M. smegmatis* $\Delta nlpR$.

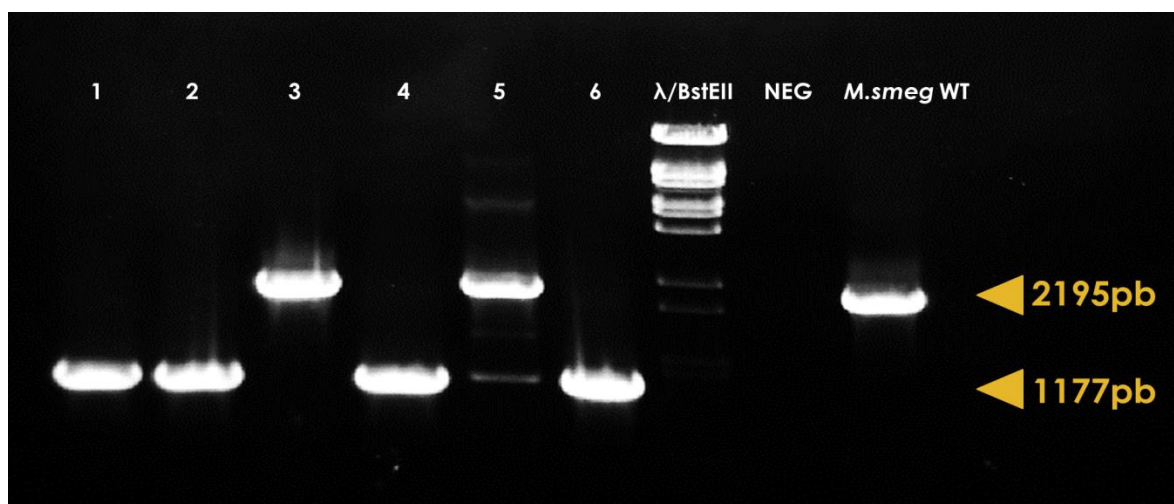


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los productos de PCR de colonia. Los productos con un tamaño aproximado de 2195 pb (calles 3 y 5) corresponden al producto de la amplificación del alelo salvaje de MSMEG_0432, mientras que el de un tamaño aproximado de 1177 pb (calles 1, 2, 4 y 6) corresponden al producto de amplificación del alelo deletado. Las últimas dos calles corresponden a los controles negativo y *M. smegmatis* salvaje respectivamente

2 Construcción de la cepa complementante *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$

Para la construcción de esta cepa *M. smegmatis* mc^2155 fue transformada simultáneamente con los plásmidos pJC0432 y MT13 por electroporación y sembradas en placas en presencia de Sm y Am. Las colonias resultantes fueron fraccionadas para su uso posterior como la cepa *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$.

El detalle del funcionamiento del sistema de complementación TetON se detalla en la figura 8.

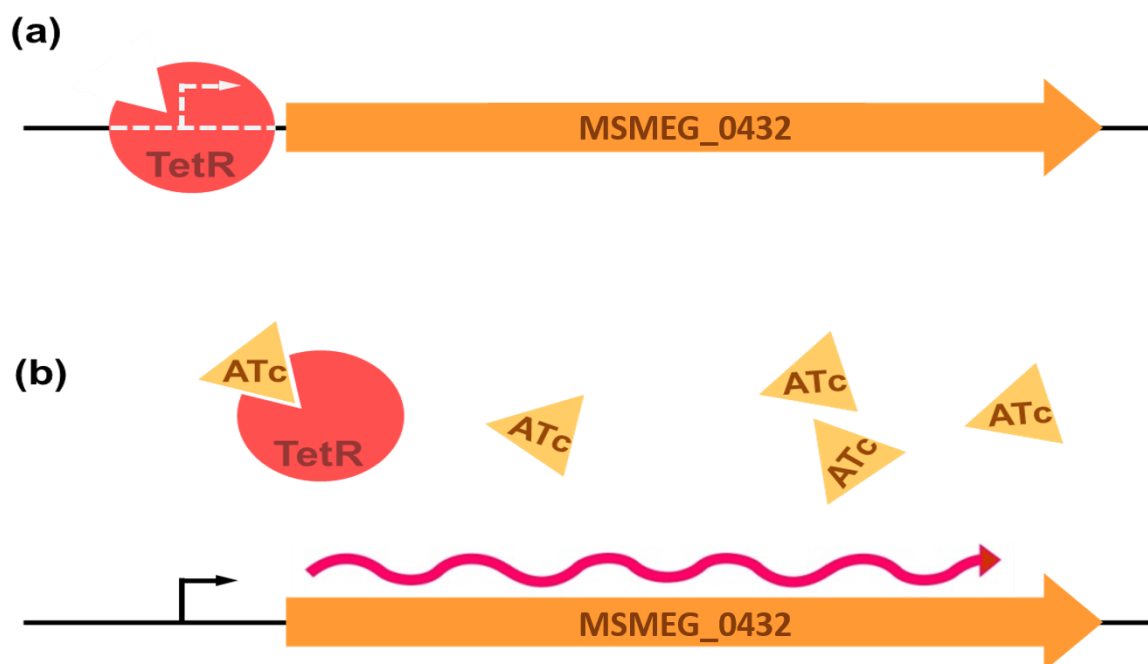


Figura 8. Sistema de complementación TetON. El represor TetR, codificado en el plásmido episomal MT13, se une a la región operadora del promotor del gen en estudio, bloqueando su transcripción (a). Mediante el agregado de ATc como inductor, el regulador se libera de la región operadora, permitiendo así la transcripción de MSMEG_0432 (b)⁵⁷⁻⁵⁹.

3 Ensayos de crecimiento de *M. smegmatis* utilizando cloruro de amonio como única fuente de nitrógeno

Para determinar la capacidad de la mutante *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ de crecer utilizando distintas fuentes de nitrógeno, se realizaron curvas de crecimiento junto a la cepa salvaje. Las mismas fueron crecidas en medio Sauton mínimo suplementado con las siguientes concentraciones de cloruro de amonio:

- NH_4Cl 30 mM (Medio rico en nitrógeno)
- NH_4Cl 1 mM (Medio pobre en nitrógeno)

En la figura 9 se observan las curvas de este experimento, para las dos condiciones ensayadas.

Los resultados de ambas curvas no arrojaron diferencias apreciables en los perfiles de crecimiento entre ambas cepas cuando se utilizó amonio como fuente de nitrógeno. Si bien a mayores concentraciones de nitrógeno la pendiente de la fase exponencial y la DO_{600} en fase estacionaria alcanzó valores más altos que a concentraciones más bajas, las curvas para ambas cepas en un mismo medio fueron superponibles, indicando un crecimiento similar.

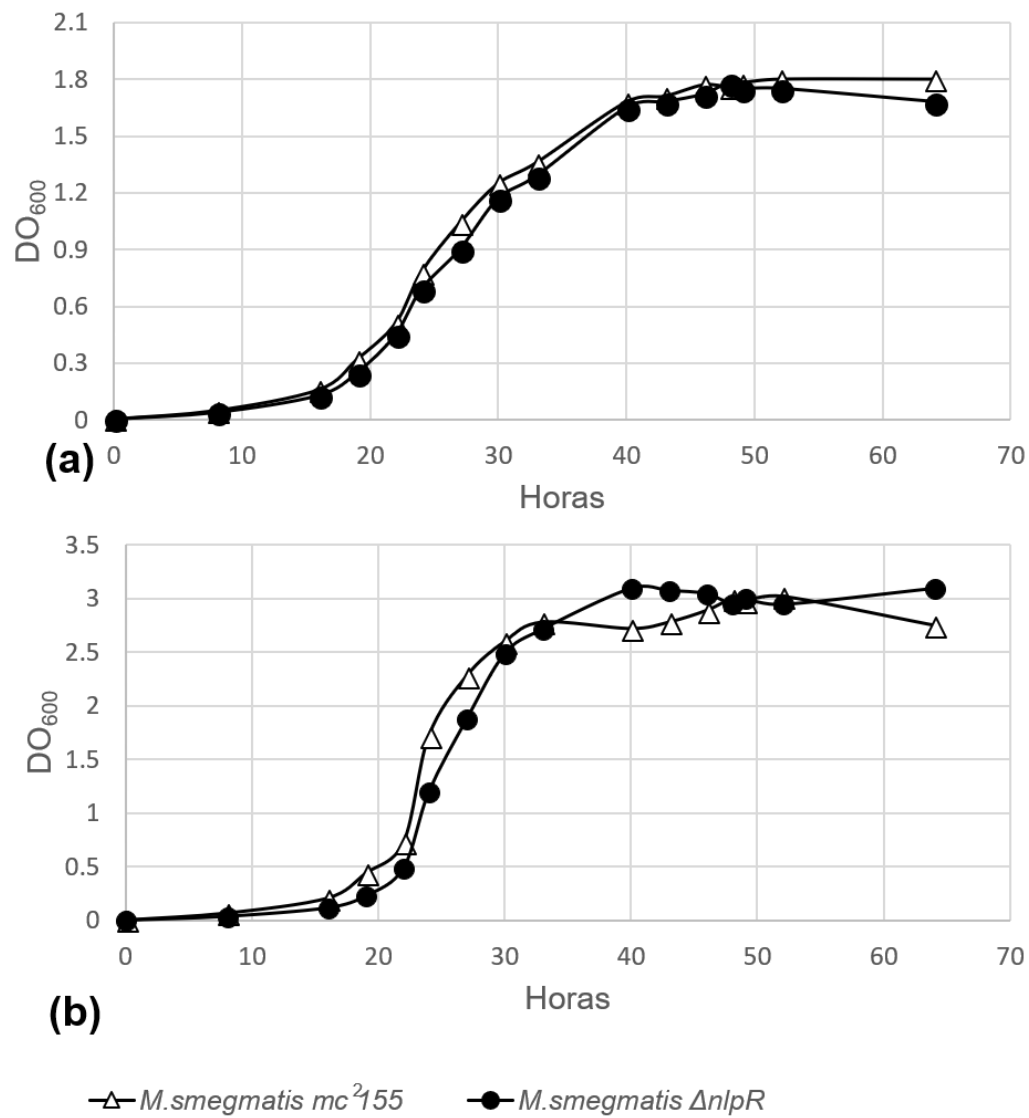


Figura 9. Curvas de crecimiento para las cepa salvaje y *M. smegmatis* $\Delta nlpR$. Fueron inoculadas en medio Sauton mínimo suplementado con cloruro de amonio 1 mM **(a)** o cloruro de amonio 30 mM **(b)** y su crecimiento seguido por lecturas de DO₆₀₀ durante 56 hs.

4 Crecimiento de *M. smegmatis* utilizando nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno

Para estudiar las características de crecimiento de la cepa salvaje y de la mutante *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ en presencia de nitrato como única fuente de nitrógeno, se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo suplementados con nitrato de potasio 1 mM.

En la figura 10 se observan las curvas de este experimento.

En este medio, la cepa salvaje creció hasta una DO_{600} en fase estacionaria de aproximadamente 1,55, ingresando a la fase exponencial de crecimiento aproximadamente a las 30 h, sin embargo, la cepa mutante no logró superar una DO_{600} de 0,15

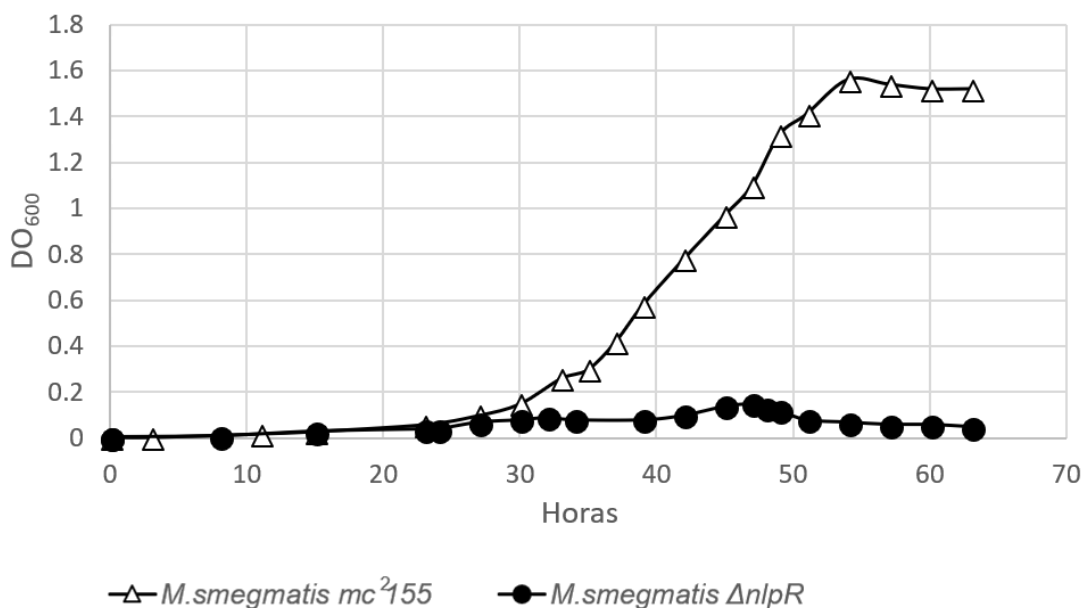


Figura 10. Curva de crecimiento de las cepas mutante y salvaje. Las mismas fueron inoculadas en medio Sauton mínimo suplementado con nitrato de potasio 1 mM y su crecimiento seguido por lecturas de DO_{600} durante 56 hs.

5 Ensayos de crecimiento de *M. smegmatis* utilizando nitrito de sodio como única fuente de nitrógeno

Para estudiar el crecimiento de la cepa salvaje y de la mutante *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ en presencia de nitrito como única fuente de nitrógeno, se realizaron curvas de crecimiento de ambas cepas en medio Sauton mínimo suplementado con nitrito de sodio 1 mM.

Del mismo modo que ocurrió con el crecimiento en nitrato, mientras que la cepa salvaje fue capaz de crecer en este medio, llegando en fase estacionaria hasta una DO_{600} 1,65, la cepa mutante mostró una capacidad de crecimiento disminuida, llegando solamente hasta una DO_{600} 0,4 en fase estacionaria.

En la figura 11 se observan las curvas de este experimento.

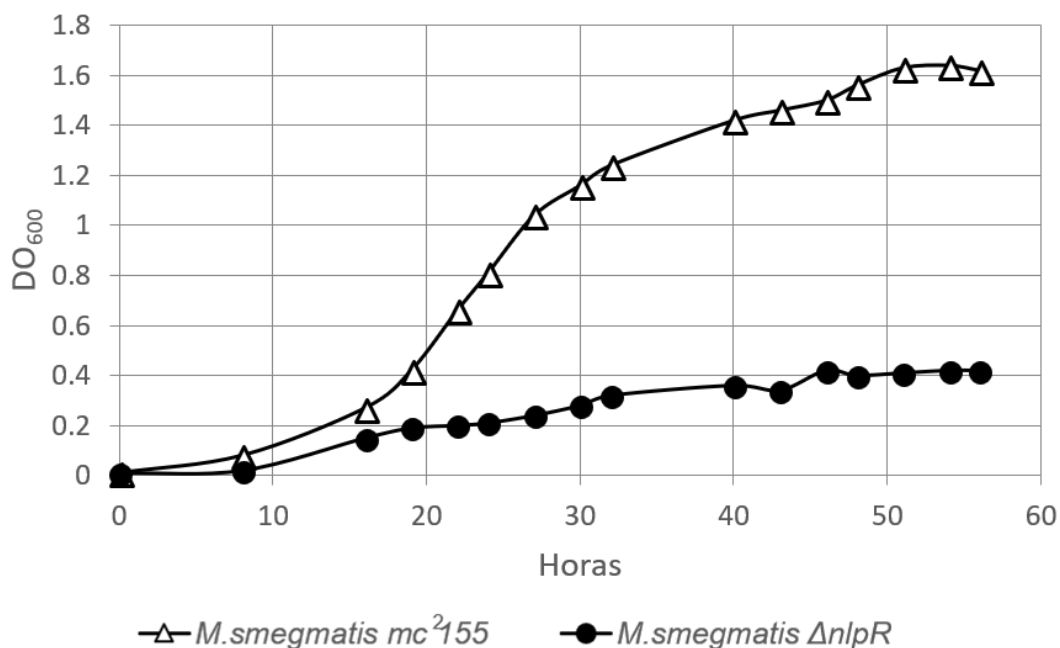


Figura 11. Curva de crecimiento de las cepas mutante y salvaje. Las cepas fueron inoculadas en medio Sauton mínimo suplementado con nitrito de sodio 1 mM y su crecimiento seguido por lecturas a DO_{600} nm durante 56 hs.

6 Crecimiento de cepa complementante *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$ en medio mínimo con nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno

La cepa complementante *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$, que posee una copia del gen MSMEG_0432 salvaje bajo control de un promotor inducible por anhidrotetraciclina (ATc), fue crecida en medio Sauton mínimo suplementado con nitrato de potasio como única fuente de nitrógeno. Se analizó el crecimiento en paralelo de la cepa salvaje, *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ y la cepa mutante complementada *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$ utilizando distintas concentraciones de ATc.

En la figura 12 se muestran los perfiles de crecimiento de este experimento.

Las curvas de crecimiento muestran que al igual que *M. smegmatis* $\Delta nlpR$, la cepa complementante en ausencia de inductor (condiciones donde no se expresa MSMEG_0432) no muestra un crecimiento significativo alcanzando una DO₆₀₀ final de 0,15. Mientras que, en las mismas condiciones, la cepa salvaje alcanza una DO₆₀₀ de 1,6 en fase estacionaria.

Cuando se analizó la cepa complementante con distintas concentraciones de ATc se observó que a 2 ng/mL del inductor, la bacteria tampoco mostró un crecimiento apreciable. Sólo cuando la concentración de ATc fue igual o superior a 5 ng/mL, su perfil de crecimiento volvió a ser similar al de la cepa salvaje. En todas estas condiciones la cepa *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$ alcanzó una DO₆₀₀ máxima de aproximadamente 1,5 en fase estacionaria, y la pendiente de la fase exponencial fue igual a la de la cepa salvaje, aunque con una fase de adaptación aproximadamente 5 horas más larga.

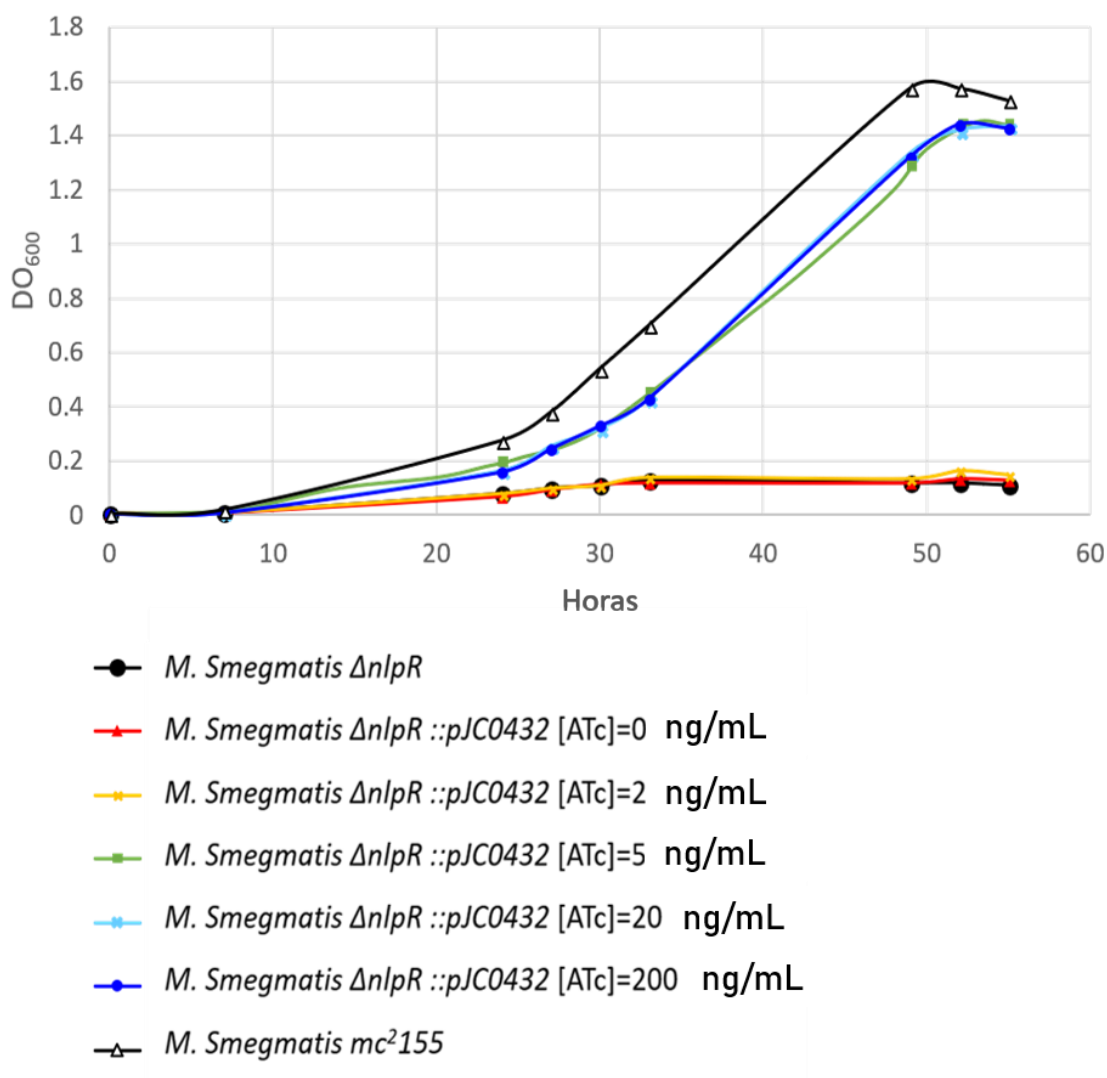


Figura 12. Curva de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* $\Delta nlpR$, *M. smegmatis* $\Delta nlpR :: pJC0432$ y *M. smegmatis* salvaje. Las cepas fueron inoculadas en medio Sauton mínimo suplementado con nitrato de potasio 1 mM y ATc según se indica.

7 Crecimiento de cepa complementante *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$ en medio mínimo con nitrito de sodio como única fuente de nitrógeno

La cepa complementante *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$, posee una copia del gen MSMEG_0432 salvaje bajo control de un promotor inducible por anhidrotetraciclina (ATc). La misma fue crecida en medio Sauton mínimo, suplementado con nitrito de sodio como única fuente de nitrógeno disponible y utilizando distintas concentraciones de ATc. Su crecimiento fue analizado en paralelo al de la cepa salvaje y la mutante $\Delta nlpR$.

En la figura 13 se muestran los perfiles de crecimiento de este experimento.

Las curvas de crecimiento en estas condiciones muestran que al igual que la cepa *M. smegmatis* $\Delta nlpR$, incapaz de crecer en nitrito, la cepa complementante en ausencia de inductor (condiciones donde no se expresa MSMEG_0432) no muestra un crecimiento significativo alcanzando una DO_{600} final de 0,4. Mientras que, en las mismas condiciones, la cepa salvaje alcanza una DO_{600} de 1,7 en fase estacionaria.

Al analizar el crecimiento de la cepa complementante, se observó que una concentración mínima de 2 ng/mL del inductor, era suficiente para que la bacteria restaure un crecimiento similar al de la cepa salvaje.

Para concentraciones iguales o mayores a 2 ng/mL de ATc, la cepa *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$ alcanzó una DO_{600} máxima de aproximadamente 1,6 en fase estacionaria, y la pendiente de la fase exponencial fue similar a la de la cepa salvaje, sin deferencias en la duración de la fase de latencia.

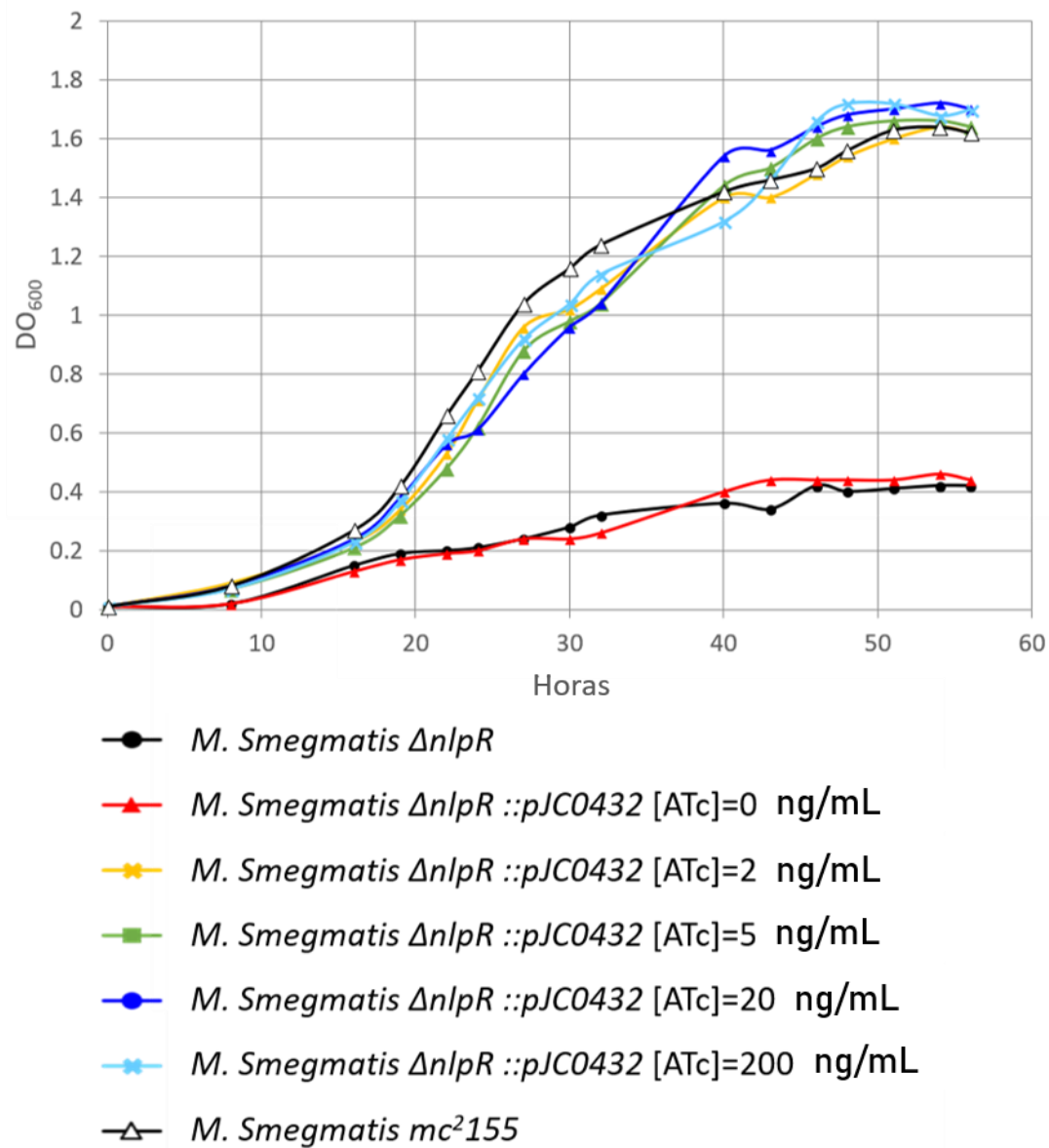


Figura 13. Curva de crecimiento de las cepas *M. smegmatis* $\Delta nlpR$, *M. smegmatis* $\Delta nlpR::pJC0432$ y *M. smegmatis* salvaje. Las cepas fueron inoculadas en medio Sauton mínimo suplementado con nitrito de sodio 1 mM y distintas concentraciones de ATc según corresponda.

8 Análisis de la acumulación de TAG en la cepa mutante

Para analizar la acumulación de TAG y otros lípidos neutros durante diferentes puntos del crecimiento de las cepas de *M. smegmatis* en estudio, se llevaron a cabo ensayos de TLC, variando la disponibilidad de cloruro de amonio como única fuente de nitrógeno

Se cultivaron las cepas *M. smegmatis* salvaje y *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ en medios conteniendo 1 mM y 30 mM de cloruro de amonio, como medio pobre y rico en nitrógeno respectivamente. Se tomaron alícuotas de cultivo a mitad de la fase exponencial (28 hs) y la fase estacionaria tardía (48 hs). Las células fueron recolectadas centrifugando un volumen normalizado por DO_{600} para cada muestra, y sus lípidos fueron extraídos por el protocolo previamente mencionado. Los resultados de las TLC del presente estudio se muestran en la figura 14.

Si bien *M. smegmatis* salvaje acumula TAG en fase estacionaria tardía en medios con baja disponibilidad de nitrógeno, no se observa el mismo comportamiento en medios con alta cantidad de este nutriente. No obstante, al comparar la síntesis de TAG de ambas cepas en el mismo medio en fase exponencial de crecimiento no podemos observar una diferencia apreciable.

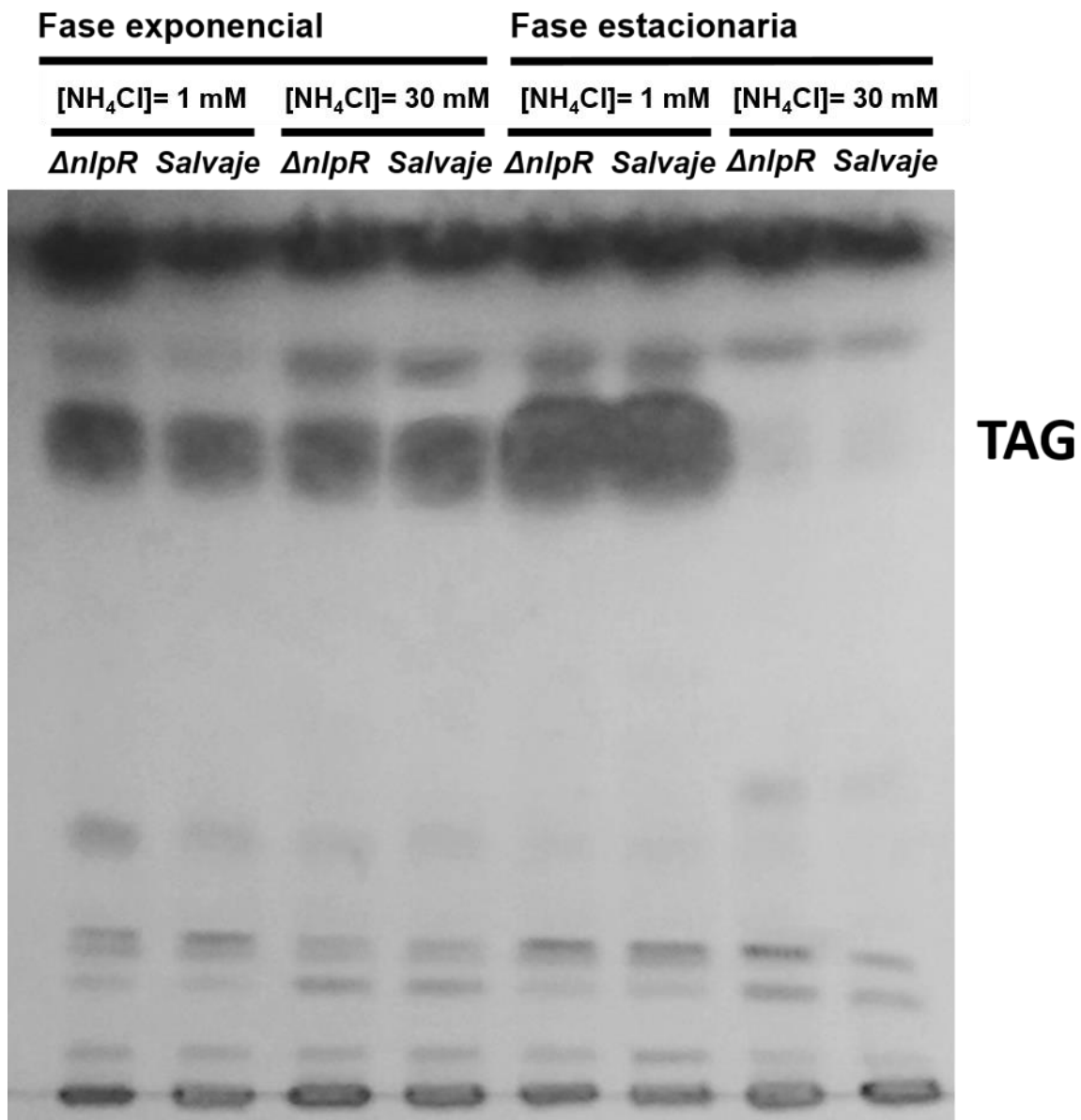


Figura 14. Análisis de la síntesis de TAG. Para los lípidos totales, extraídos de *M. smegmatis* *ΔnlpR* y *M. smegmatis* crecidas en medio mínimo suplementado con dos concentraciones diferentes de amonio.

9 Análisis de la síntesis *de novo* de TAG en la cepa mutante.

Para el análisis de la síntesis de TAG en distintos medios y etapas de crecimiento, las cepas *M. smegmatis* salvaje y *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ fueron crecidas en medio Sauton mínimo suplementado con cloruro de amonio 1 mM y 30 mM como única fuente de nitrógeno. Durante la fase exponencial (24 hs) y estacionaria tardía (48 hs) las células fueron alicuotadas e incubadas por una hora con [^{14}C]-acetato según se detalló anteriormente. Los extractos lipídicos luego de dicha incubación fueron separados por TLC y la autoradiografía correspondiente se puede observar en la figura 15.

La tasa de síntesis de TAG varía a lo largo de la curva de crecimiento y según la condición a la cual la célula es sometida. En la cepa salvaje, la producción de los mismos es mayor en medios pobres en nitrógeno y disminuye notablemente al aumentar la disponibilidad del mismo. Sin embargo, al compararla con los cultivos de la cepa *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ suplementada con la misma concentración de amonio, en el mismo estadio de crecimiento, no se observan diferencias apreciables en la síntesis *de novo* de TAG.

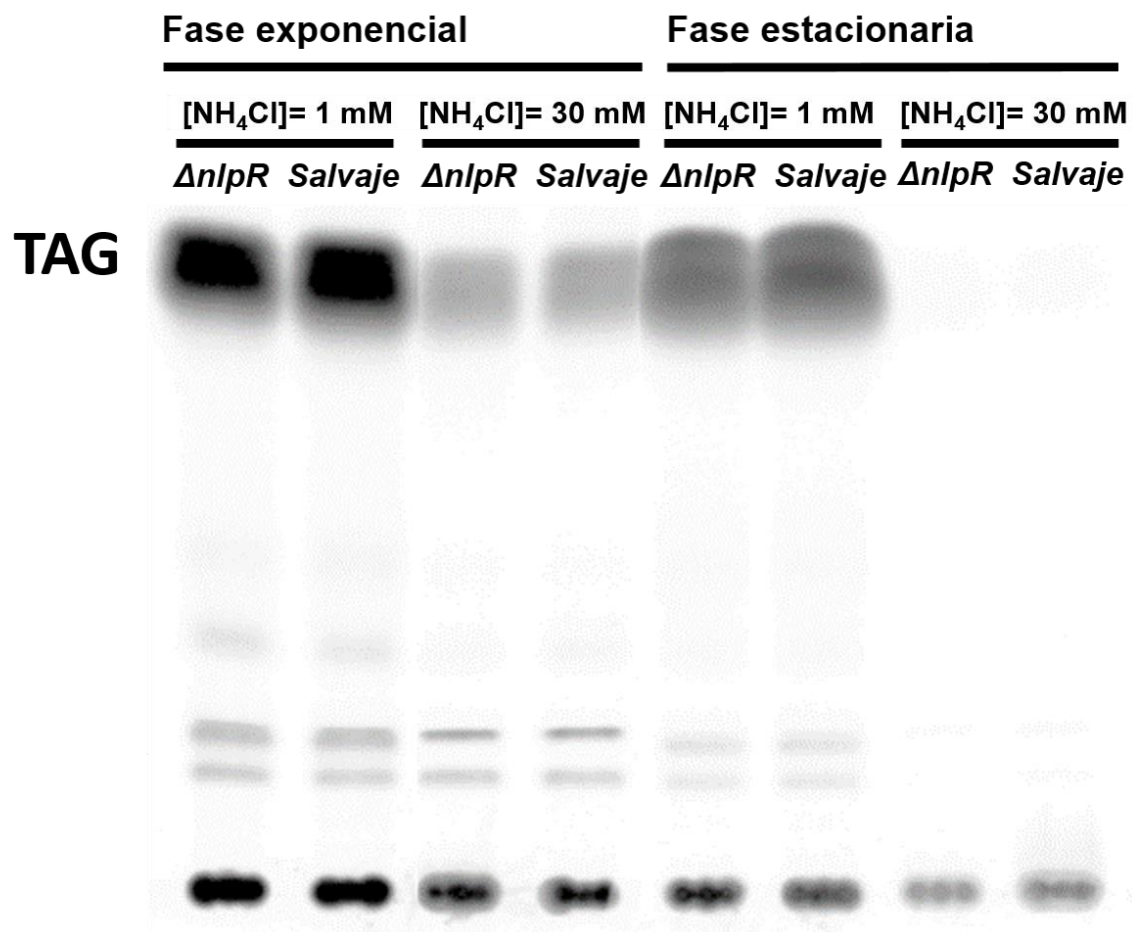


Figura 15. Análisis de la síntesis *de novo* de TAG. Lípidos totales fueron extraídos de la mutante *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ y *M. smegmatis* salvaje crecidas en dos concentraciones diferentes de amonio y marcadas con [¹⁴C]-acetato. Los mismos fueron separados por TLC y revelados por autoradiografía. La extracción de lípidos fue realizada normalizando el número de células por DO₆₀₀.

10 Análisis de la sobreexpresión del gen MSMEG_0432 sobre el perfil de síntesis de TAG.

Las cepas *M. smegmatis* ::pSM128 (con el vector pSM128 vacío integrado a su genoma) y *M. smegmatis*::pJC0432 (que lleva integrado el vector pJC0432 que contiene una copia del gen MSMEG_0432 bajo un promotor constitutivo) fueron crecidas en medio Sauton, suplementado con 1 mM y 30 mM de cloruro de amonio. Tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento los cultivos fueron centrifugados y los lípidos extraídos según el protocolo descrito para el análisis de la producción de TAG.

Los resultados de la TLC del experimento se muestran en la figura 16.

En general no se aprecian diferencias marcadas en la abundancia de TAG entre las cepas salvaje y la sobreexpresante del regulador MSMEG_0432, tanto en las fases exponenciales como en las fases estacionarias de los medios suplementados con 1 mM y 30 mM de cloruro de amonio.

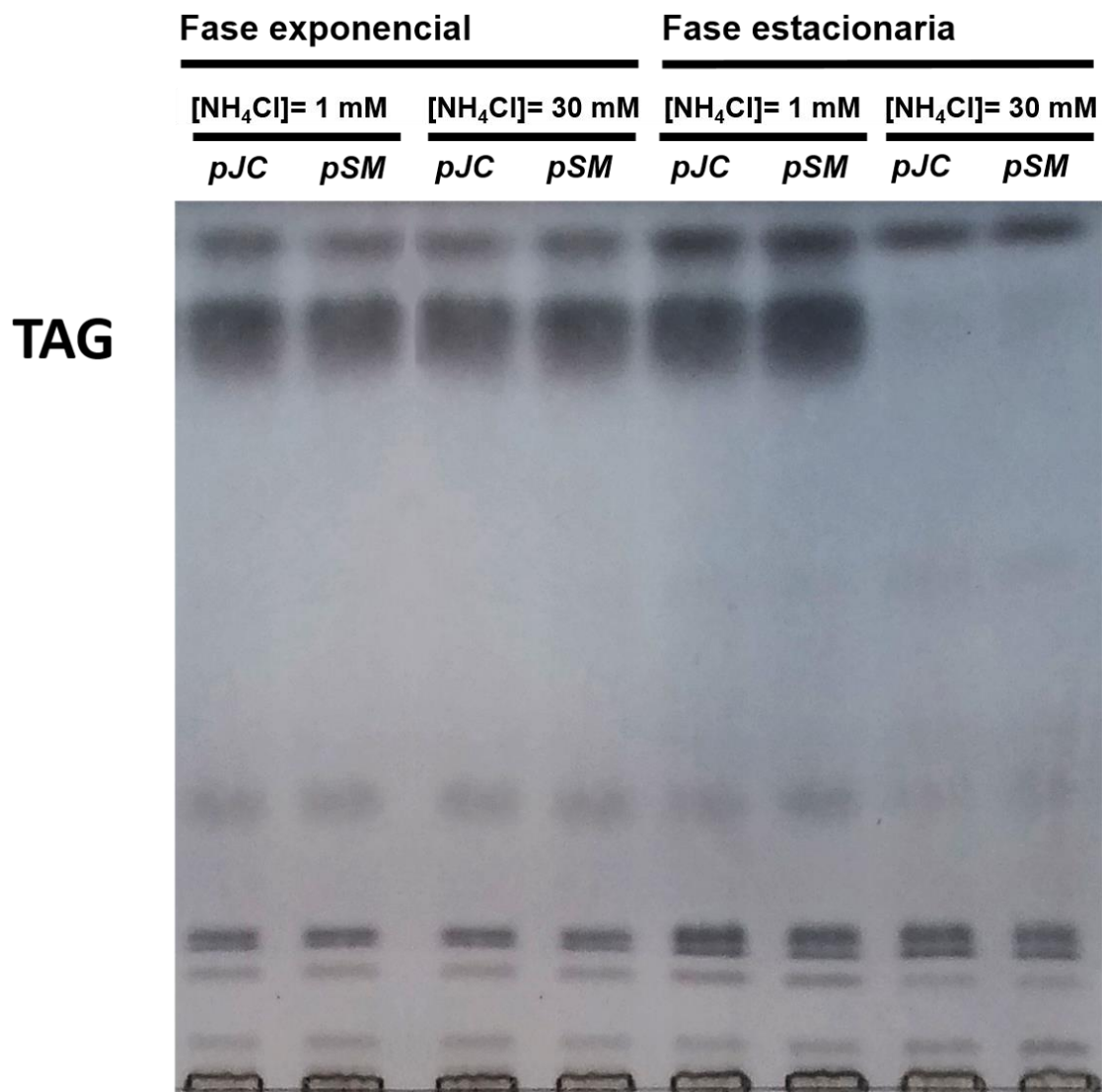


Figura 16. Análisis de la síntesis de TAG. Se observan la cepa sobreexpresante *M. smegmatis*::*pJC0432* y *M. smegmatis*::*pSM128* crecidas en medio mínimo Sauton suplementada con dos concentraciones diferentes de amonio en fase exponencial y estacionaria.

Discusión y Conclusiones

En el presente trabajo de tesina se propuso la construcción de una mutante de *M. smegmatis* en el gen MSMEG_0432, el cual codifica para una proteína ortóloga al regulador transcripcional NlpR previamente caracterizado en otros organismos del orden *actinomycetales*. Posteriormente se propuso el estudio de las características fenotípicas de dicha mutante; puntualmente estudios sobre el metabolismo del nitrógeno y carbono, con el fin de dilucidar el posible rol del regulador en estas vías metabólicas.

Primeramente, la construcción de la cepa mutante fue realizada de manera exitosa. La amplificación de los fragmentos adyacentes del gen a través de PCR y la construcción del alelo con una delección en fase dentro del vector suicida pPR27 fue realizada y corroborada satisfactoriamente previo a la transformación de las células de *M. smegmatis* salvaje. Los eventos de recombinación fueron efectivamente seleccionados utilizando los marcadores provistos por el vector. El genotipo de la cepa mutante fue corroborado por PCR de colonia, la cual indica que el reemplazo alélico tuvo lugar, quedando la variante que porta la delección en fase integrado en el locus normal, en reemplazo del gen MSMEG_0432 salvaje.

Los resultados de los ensayos de crecimiento utilizando amonio como única fuente de nitrógeno no mostraron diferencias en las curvas de crecimiento midiendo DO₆₀₀ en función del tiempo. La duración del periodo de latencia de ambas cepas fue similar, así como las pendientes y la duración de la fase de crecimiento exponencial. Aunque la DO₆₀₀ alcanzada al llegar a la fase estacionaria varió según la disponibilidad de la fuente de nitrógeno en cada ensayo, tanto la cepa salvaje como la mutante mostraron valores similares. Por lo expuesto anteriormente podemos concluir que la disrupción del regulador transcripcional codificado por el gen MSMEG_0432 no produce un cambio apreciable en el crecimiento de la cepa en el medio mínimo ensayado utilizando cloruro de amonio como única fuente de nitrógeno disponible. Esto sugiere que dicho regulador no tendría relevancia en los procesos de asimilación, transporte y metabolismo de este compuesto en la forma de catión amonio.

Sin embargo, en las curvas de crecimiento realizadas en medio mínimo, utilizando nitrato como única fuente de nitrógeno, se observó que la cepa mutante en el gen MSMEG_0432 mostraba una marcada deficiencia de crecimiento con respecto a la cepa de *M. smegmatis* salvaje. Debido a que luego de 56 horas de cultivo, la cepa mutante no pudo superar una DO₆₀₀ de 0,15, se concluye que la misma es incapaz de crecer en un medio mínimo cuando se utiliza el anión nitrato como única fuente de nitrógeno. La complementación de la cepa mutante *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ con una copia salvaje del gen MSMEG_0432, bajo el control del promotor P_{smyc}, cuya transcripción puede ser regulada por el agregado de ATc, mostró un restablecimiento del crecimiento comparable al de la cepa salvaje en este medio. Esto se observó cuando las concentraciones del inductor fueron mayores o iguales a 5 ng/mL. Los resultados mostraron que una menor concentración del inductor no es suficiente para restaurar el crecimiento de esta cepa.

Al estudiar el crecimiento de la cepa mutante *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ y la cepa salvaje en medio mínimo utilizando nitrito como única fuente de nitrógeno, se observó nuevamente que la cepa mutante presentaba una marcada disminución en el crecimiento con respecto a la cepa salvaje. Si bien la DO₆₀₀ de la curva de crecimiento de la cepa mutante llega a un valor de 0,4 luego de 56 horas, este valor es cuatro veces inferior al observado para la cepa salvaje, la cual alcanza una DO₆₀₀ de 1,64. Este último valor, si bien fue mayor al crecimiento en nitrato, fue significativamente menor al de la cepa salvaje. Otra diferencia observada en comparación con las curvas de crecimiento en nitrato fue el tiempo de duración de la fase de adaptación, el cual tiene una duración mucho menor en nitrito, comenzando la fase exponencial aproximadamente 18 horas posteriores al tiempo de inoculación. Por lo tanto, se concluye que la mutante en el gen en estudio presenta una capacidad de crecimiento significativamente menor con respecto a la cepa salvaje al utilizar el anión nitrito como única fuente de nitrógeno. Sin embargo, la cepa complementante sí mostró niveles de crecimiento comparables a la cepa salvaje, cuando la misma era crecida en nitrito como única fuente de nitrógeno y

con el agregado de una cantidad mayor o igual a 2 ng/mL de ATc. Mientras que en ausencia del inductor no se observó un rescate del crecimiento

La capacidad de producción y acumulación de lípidos de reserva en la cepa *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ no muestra diferencias significativas en comparación con la cepa salvaje. Al ser crecidas en medio Sauton mínimo suplementadas con cloruro de amonio 1 mM, condición reportada como pobre en nitrógeno por la bibliografía, se observa una acumulación progresiva de los TAG durante la fase exponencial, culminando en una gran cantidad acumulada de este compuesto en fase estacionaria. Por otro lado, medios mínimos suplementados con concentraciones mayores de amonio, muestran una menor acumulación de TAG en fase exponencial, la cual decrece notablemente al punto de no ser detectado por las técnicas empleadas al llegar a fase estacionaria.

Del mismo modo, el nivel de síntesis *de novo* de TAG durante la fase exponencial para los cultivos pobres en amonio es significativamente mayor que aquellos con mayor disponibilidad de este compuesto. Estas diferencias se mantienen al llegar a la fase estacionaria, donde se observa un mayor nivel de biosíntesis de TAG en medios pobres, en tanto que en medios ricos su nivel es indetectable a través de las técnicas empleadas. Los resultados del presente trabajo mostraron que no existe diferencia en la síntesis *de novo* de TAG entre las cepas salvaje y *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ para las mismas condiciones y etapas de crecimiento.

Finalmente, la sobreexpresión del regulador transcripcional en estudio en una cepa salvaje, no produjo un cambio significativo en los niveles de TAG acumulado, ya sea en distintas etapas de crecimiento o bien en presencia de distintas concentraciones de nitrógeno, en comparación con la cepa isogénica *M. smegmatis* $::pSM128$. En conclusión no se encontraron evidencias de la influencia del regulador transcripcional NlpR en la síntesis de TAG en *M. smegmatis* para las condiciones ensayadas. Estos resultados, si bien son diferentes a las observaciones previas sobre el rol del regulador NlpR en *R. jostii*, constituyen información relevante sobre la compleja red del metabolismo lipídico en micobacterias.

El análisis de las curvas de crecimiento en su conjunto sugiere la importancia del regulador transcripcional NlpR en la modulación del metabolismo de nitrógeno. Considerando que en *M. smegmatis* la transcripción de este gen se encuentra bajo el control de GlnR, un regulador central del metabolismo de nitrógeno, se sugiere que NlpR actuaría como un regulador transcripcional de jerarquía intermedia, respondiendo a los cambios ambientales a través de GlnR. La capacidad de la cepa *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ para crecer en medios utilizando nitrato y nitrito como únicas fuentes de nitrógeno, se vió significativamente disminuida, mientras que la complementación de la cepa mutante con una copia salvaje del gen en cuestión, bajo el control de un promotor inducible por ATc, produjo un restablecimiento del fenotipo de crecimiento luego del agregado del inductor. Estos resultados muestran la influencia, directa o indirecta, del regulador transcripcional NlpR en la síntesis de las enzimas implicadas en la asimilación y reducción de estas fuentes de nitrógeno. A su vez, esto podría sugerir una función similar a su rol en *S. coelicolor*, donde se une a la región reguladora y activa la transcripción del gen de la enzima nitrito reductasa.

No obstante, aún existen diferencias en los experimentos de crecimiento realizados al variar la fuente de nitrógeno entre nitrato o nitrito. Principalmente, la DO₆₀₀ que alcanza la cepa *M. smegmatis* $\Delta nlpR$ en fase estacionaria es significativamente menor para los medios suplementados con nitrato (0,15) que aquellos suplementados con nitrito (0,40). A su vez se requieren concentraciones menores de ATc para restaurar el crecimiento de la cepa complementante en medios suplementados con este último. Una posible explicación consiste en que el nitrato es una forma más oxidada del nitrógeno, y se requieren dos complejos enzimáticos (nitrato y nitrito reductasa) para su reducción a amonio, la forma asimilable del nitrógeno en la célula; mientras que el nitrito sólo requiere la enzima nitrito reductasa para alcanzar este estado. Dado que los estudios realizados sugieren la relevancia de NlpR en la activación de genes del metabolismo del nitrógeno, una pérdida de función de este regulador ocasionaría más problemas para la reducción del nitrato a amonio que en el caso del nitrito. A su vez, la activación de la síntesis de la enzima nitrato reductasa puede ser más dependiente

de NlpR que en el caso de la nitrito reductasa. Por esta razón, la célula sería más tolerante a crecer en medios suplementados con este último.

El trabajo realizado en esta tesina permitió realizar un primer acercamiento al rol fisiológico del regulador transcripcional NlpR dentro de la red regulatoria del organismo modelo *M. smegmatis*. Debido a su relevancia dentro del metabolismo de compuestos oxidados del nitrógeno, se mantiene abierto el interrogante sobre su esencialidad para la infección y virulencia en organismos de relevancia médica como *M. tuberculosis*, teniendo en cuenta las adaptaciones metabólicas requeridas para enfrentar diversos tipos de estrés dentro del hospedador. Por lo tanto, este proyecto de tesina señala la importancia de la caracterización de NlpR en dicho organismo, considerando eventualmente su posible utilización como blanco de drogas antimicobacterianas.

Referencias bibliográficas

1. Koch Robert. The etiology of tuberculosis. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.* **251**, 287–96 (1982).
2. O'Garra, A. *et al.* The immune response in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 475–527 (2013).
3. Velayati, A. A. *et al.* Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. *Chest* **136**, 420–425 (2009).
4. Chao, M. C. & Rubin, E. J. Letting sleeping dos lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 293–311 (2010).
5. Brennan, P. J. & Nikaido, H. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 29–63 (1995).
6. Tortoli, E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **48**, 159–78 (2006).
7. Shiloh, M. U. & Champion, P. A. D. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about Mycobacterium tuberculosis pathogenesis? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 86–92 (2010).
8. Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. & Jacobs, W. R. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of Mycobacterium smegmatis. *Mol. Microbiol.* **4**, 1911–9 (1990).
9. Etienne, G. *et al.* The cell envelope structure and properties of Mycobacterium smegmatis mc(2)155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology* **151**, 2075–86 (2005).
10. Trias, J., Jarlier, V. & Benz, R. Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science* **258**, 1479–81 (1992).
11. Daffé, M. & Draper, P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 131–203 (1998).

12. Neyrolles, O. & Guilhot, C. Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis* **91**, 187–195 (2011).
13. Banerjee, A. *et al.* inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**, 227–30 (1994).
14. Baulard, A. R. *et al.* Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **275**, 28326–31 (2000).
15. Kilburn, J. O. & Takayama, K. Effects of ethambutol on accumulation and secretion of trehalose mycolates and free mycolic acid in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20**, 401–4 (1981).
16. Zhang, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 529–64 (2005).
17. Kremer, L. *et al.* Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**, 16857–64 (2000).
18. Daffé, M. & Reyrat, J.-M. *The mycobacterial cell envelope*. (ASM Press, 2008).
19. Queval, C. J., Brosch, R. & Simeone, R. The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).
20. Ehrt, S. & Schnappinger, D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell. Microbiol.* **11**, 1170–8 (2009).
21. Saunders, B. M. & Cooper, A. M. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 334–41 (2000).
22. SEVER, J. L. & YOUMANS, G. P. The relation of oxygen tension to virulence

of tubercle bacilli and to acquired resistance in tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **101**, 193–202

23. Wayne, L. G. & Sohaskey, C. D. Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 139–163 (2001).
24. Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F. & Altare, F. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 139127 (2012).
25. Santucci, P. *et al.* Experimental Models of Foamy Macrophages and Approaches for Dissecting the Mechanisms of Lipid Accumulation and Consumption during Dormancy and Reactivation of Tuberculosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, 122 (2016).
26. Caire-Brändli, I. *et al.* Reversible lipid accumulation and associated division arrest of *Mycobacterium avium* in lipoprotein-induced foamy macrophages may resemble key events during latency and reactivation of tuberculosis. *Infect. Immun.* **82**, 476–90 (2014).
27. Boshoff, H. I. M. & Barry, C. E. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 70–80 (2005).
28. Daniel, J. *et al.* Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *J. Bacteriol.* **186**, 5017–30 (2004).
29. Low, K. L. *et al.* Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J. Bacteriol.* **191**, 5037–43 (2009).
30. Guirado, E. & Schlesinger, L. S. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Front. Immunol.* **4**, 98 (2013).
31. Leigh, J. A. & Dodsworth, J. A. Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 349–377 (2007).

32. Gouzy, A., Poquet, Y. & Neyrolles, O. Amino acid capture and utilization within the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Future Microbiol.* **9**, 631–637 (2014).
33. Lyon, R. H., Hall, W. H. & Costas-Martinez, C. Utilization of Amino Acids During Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Rotary Cultures. *Infect. Immun.* **1**, 513–20 (1970).
34. Khan, A. & Sarkar, D. Nitrate reduction pathways in mycobacteria and their implications during latency. *Microbiology* **158**, 301–7 (2012).
35. Giffin, M. M., Raab, R. W., Morganstern, M. & Sohaskey, C. D. Mutational analysis of the respiratory nitrate transporter Nark2 of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **7**, e45459 (2012).
36. Höner zu Bentrup, K. & Russell, D. G. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol.* **9**, 597–605 (2001).
37. Sohaskey, C. D. Nitrate enhances the survival of *Mycobacterium tuberculosis* during inhibition of respiration. *J. Bacteriol.* **190**, 2981–6 (2008).
38. Sohaskey, C. D. Regulation of nitrate reductase activity in *Mycobacterium tuberculosis* by oxygen and nitric oxide. *Microbiology* **151**, 3803–10 (2005).
39. Nathan, C. & Shiloh, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8841–8 (2000).
40. Davidge, K. S. & Dikshit, K. L. Haemoglobins of Mycobacteria: structural features and biological functions. *Adv. Microb. Physiol.* **63**, 147–94 (2013).
41. Jung, J.-Y. *et al.* The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. *Infect. Immun.* **81**, 3198–209 (2013).
42. Cunningham-Bussel, A., Zhang, T. & Nathan, C. F. Nitrite produced by *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages in physiologic oxygen

impacts bacterial ATP consumption and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E4256-65 (2013).

43. Hernández, M. A., Lara, J., Gago, G., Gramajo, H. & Alvarez, H. M. The pleiotropic transcriptional regulator NlpR contributes to the modulation of nitrogen metabolism, lipogenesis and triacylglycerol accumulation in oleaginous rhodococci. *Mol. Microbiol.* **103**, 366–385 (2017).
44. Alvarez, H. M., Mayer, F., Fabritius, D. & Steinbüchel, A. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Arch. Microbiol.* **165**, 377–86 (1996).
45. Hernández, M. A. *et al.* Biosynthesis of storage compounds by *Rhodococcus jostii* RHA1 and global identification of genes involved in their metabolism. *BMC Genomics* **9**, 600 (2008).
46. Amin, R., Reuther, J., Bera, A., Wohlleben, W. & Mast, Y. A novel GlnR target gene, *nnaR*, is involved in nitrate/nitrite assimilation in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **158**, 1172–82 (2012).
47. Tiffert, Y. *et al.* The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Mol. Microbiol.* **67**, 861–80 (2008).
48. Pullan, S. T., Chandra, G., Bibb, M. J. & Merrick, M. Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes. *BMC Genomics* **12**, 175 (2011).
49. Jeßberger, N. *et al.* Nitrogen starvation-induced transcriptome alterations and influence of transcription regulator mutants in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Res. Notes* **6**, 482 (2013).
50. Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. & Jacobs, W. R. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**, 1911–9 (1990).
51. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.*

Mol. Biol. **166**, 557–80 (1983).

52. Michelsen, B. K. Transformation of *Escherichia coli* increases 260-fold upon inactivation of T4 DNA ligase. *Anal. Biochem.* **225**, 172–4 (1995).
53. Pelicic, V. *et al.* Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10955–60 (1997).
54. Dussurget, O. *et al.* Transcriptional control of the iron-responsive *fbxA* gene by the mycobacterial regulator *IdeR*. *J. Bacteriol.* **181**, 3402–8 (1999).
55. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Mol. cloning a Lab. manual.* (1989).
56. Bligh, E. G. & Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
57. Ehrt, S. *et al.* Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. *Nucleic Acids Res.* **33**, e21 (2005).
58. Carroll, P., Muttucumaru, D. G. N. & Parish, T. Use of a tetracycline-inducible system for conditional expression in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3077–84 (2005).
59. Blokpoel, M. C. J. *et al.* Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. *Nucleic Acids Res.* **33**, e22 (2005).